

**Isolierung und Charakterisierung von
Proteinaseinhibitoren im Trachealsekret von
Schwein und Rind**

Wilfried Sauer

1974

Aus dem Biochemischen Laboratorium der Hals-
Nasen- Ohren- Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H.H. Naumann

Isolierung und Charakterisierung von Proteinase-
inhibitoren im Trachealsekret von Schwein und Rind

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu
Muenchen

vorgelegt von
Wilfried Sauer
Muenchen
1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hochstrasser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.1974



Herrn Priv. Doz. Dr. K. Hochstraßer möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes Dank sagen.

Außerdem gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. H. Eichner, der uns mit Rat und Tat jederzeit freundlich zur Seite stand.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T

	Seite
EINLEITUNG	1
1. Begründung der Arbeit	1
2. Weg der Bearbeitung	1
1. <u>ABSCHNITT</u> : VORKOMMEN UND EIGENSCHAFTEN VON PROTEINASEINHIBITOREN	
I. Kapitel: ENTDECKUNGSGESCHICHTE DER PROTEINASEINHIBITOREN	2
II. Kapitel: ENTWICKLUNG DER PROBLEM- STELLUNG DIESER ARBEIT	3
III. Kapitel: ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN VON PROTEINASEINHIBITOREN	4
1. Molekulargewicht von Proteinase- inhibitoren	4
2. Chemische Struktur der Proteinase- inhibitoren	4
3. Stabilität der Proteinaseinhibi- toren	4
IV. Kapitel: PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAF- TEN VON PROTEINASEINHIBI- TOREN	5
1. Pflanzliche Inhibitoren	5
2. Tierische und menschliche Inhi- bitoren	5
V. Kapitel: PHARMAKOLOGISCHE EIGEN- SCHAFTEN VON PROTEINASE- INHIBITOREN	7
1. Proteinaseinhibitoren in der Schocktherapie	7
2. Proteinaseinhibitoren in der Therapie von Blugerinnungsstö- rungen	7
3. Proteinaseinhibitoren in der Pan- kreatitistherapie	8

	Seite
2. <u>ABSCHNITT</u> : EIGENE UNTERSUCHUNGEN	9
I. Kapitel: TRACHEALSEKRET SCHWEIN	9
1. Voruntersuchungen	9
2. Isolierung des Inhibitors aus Schweinetrachealsekret	9
3. Reindarstellung des Inhibitors aus den inhibitorhaltigen Fraktionen	10
4. Trypsinhemmkurve	11
5. Chymotrypsinhemmkurve	12
6. Plasminhemmkurve	12
7. Kallikreinhemmtest	12
8. Temporäre Hemmung	13
9. Fibrinagarelektrophorese	13
10. Bestimmung des Molekulargewichtes des Inhibitors aus Schweinetrachealsekret	14
II. Kapitel: TRACHEALSEKRET RIND	14
1. Voruntersuchungen	14
2. Isolierung des Inhibitors aus Rindertrachealsekret	15
3. Reindarstellung des Inhibitors aus den inhibitorhaltigen Fraktionen	16
4. Trypsinhemmkurve	17
5. Chymotrypsinhemmkurve	17
6. Plasminhemmkurve	17
7. Kallikreinhemmtest	18
8. Temporäre Hemmung	18
9. Fibrinagarelektrophorese	18
10. Molekulargewichtsbestimmung des Inhibitors aus Rindertrachealsekret	19

III

	Seite
III. Kapitel: SERUM SCHWEIN	19
1. Voruntersuchungen	19
2. Isolierung des Inhibitors aus Schweineserum	20
3. Trypsinhemmkurve	20
4. Chymotrypsinhemmkurve	21
5. Fibrinagarelektrophorese	21
6. Molekulargewichtsbestimmung des Inhibitors aus Schweineserum	21
IV. Kapitel: SERUM RIND	21
1. Voruntersuchungen	21
2. Isolierung des Inhibitors aus Rinderserum	22
3. Trypsinhemmkurve	22
4. Chymotrypsinhemmkurve	23
5. Fibrinagarelektrophorese	23
6. Molekulargewichtsbestimmung des Inhibitors aus Rinderserum	23
V. Kapitel: UNTERSUCHUNG AUF HEMM- AKTIVITÄT IN HOMOGENI- SATEN VON SCHLEIMHAUT- GEWEBEN DER DARMABSCHNIT- TE DES SCHWEINES	24
3. <u>ABSCHNITT</u> : MATERIAL UND METHODIK	25
I. Kapitel: MATERIAL	25
1. Gewinnung des verwendeten Ma- terials	25
2. Schwierigkeiten des Materials	25

IV

	Seite
II. Kapitel: METHODIK	26
1. Definition der Internationalen Inhibitoreinheit	26
2. Der Trypsinhemmtest	27
3. Arbeitsgänge zur Isolierung des Inhibitors	30
4. Der Chymotrypsinhemmtest	32
5. Der Kallikreinhemmtest	34
6. Der Plasminhemmtest	37
7. Die Fibrinagarelektrophorese	38
8. Die Temporäre Hemmung	41
9. Die Hemmkurve und das Hemmspektrum	43
4. <u>ABSCHNITT:</u> ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	45
I. Kapitel: ZUSAMMENFASSUNG	45
1. Trachealsekret Schwein	45
2. Serum Schwein	45
3. Trachealsekret Rind	46
4. Serum Rind	46
II. Kapitel: DISKUSSION	47
LITERATURVERZEICHNIS	49
ANHANG	53

E I N L E I T U N G

1. Begründung der Arbeit

Im Rahmen der Arbeiten von Herrn Priv. Doz. Dr.K. Hochstraßer hatten wir die Aufgabe, in unseren Untersuchungen den Respirationstrakt von Schwein und Rind auf das Vorhandensein von Proteinaseinhibitoren zu untersuchen, diese rein darzustellen und ihre biochemischen Eigenschaften zu untersuchen.

2. Weg der Bearbeitung

Die Gewinnung des Ausgangsmaterials und die Durchführung der Experimente wurden alle in gemeinsamer Arbeit mit cand. med G. Kachel durchgeführt; die dabei erzielten Ergebnisse wurden nach Abschluß der Laboruntersuchungen in zwei Themenkreise aufgeteilt.

G. Kachel untersuchte das Nasensekret von Schwein und Rind, ich befaßte mich mit unseren Ergebnissen aus der Untersuchung des Trachealsekretes derselben Tiere.

1. A B S C H N I T T: VORKOMMEN UND EIGENSCHAFTEN VON PROTEINASEINHIBITOREN

I. Kapitel:

ENTDECKUNGSGESCHICHTE DER PROTEINASEINHIBITOREN

Die ersten Untersuchungen über Proteinaseinhibitoren gehen auf die von Weinland (1) im Jahre 1903 durchgeführten Versuche zurück. Kraut, Frey und Werle entdeckten 1930 einen Inhibitor aus Milz, Parotis und Lymphknoten von Rindern (2). Der gleiche Inhibitor wird sechs Jahre später von Kunitz und Northop in Rinderpankreas nachgewiesen (3).

Dieser Inhibitor ist der einzige, der bis heute therapeutische Anwendung gefunden hat.

Neben unspezifischen - Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein hemmenden - Inhibitoren wie demjenigen in Trasylol wurden auch spezifische Inhibitoren gefunden; diese hemmen immer nur ein bestimmtes Enzym.

In Pflanzen wurde der erste Inhibitor 1944 von Ham und Sandstedt (4) entdeckt. Dieser Inhibitor aus Sojabohnen wurde sehr sorgfältig von Kunitz untersucht (5).

Mittlerweile wurden in vielen Leguminosen, in Kartoffeln (6), Getreide (7,8,9) und Rüben Proteinaseinhibitoren nachgewiesen.

Tierische Inhibitoren fand man bislang in *Ascaris lumbricoides* suum (10,11,12,13,14,15), im Ovomucoid (16), in der Colostrummilch von Mensch, Rind und Schwein (16,17,18,19), im Humanserum (20,21,22,23), im Schafserum (24,25), im Rinderserum (10,26,27,28), im menschlichen Harn (29), in Rinderpankreas (30), Rinderparotis, Rindermilz und Rinderlymphknoten (31,32,33), in Rinderleber (34,35,36), in Rinderlunge (37), in Hundepankreas (38), in Meerschweinchenpankreas (39), in der Submandibularisdrüse der Caniden und Feliden (40) sowie im Sperma aller Säugetiere (41,42).

II. Kapitel:

ENTWICKLUNG DER PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Untersuchungen von Hochstraßer, Reichert, Schwarz, Werle und Mitarbeitern erbrachten den Nachweis von Proteinaseinhibitoren in der Schleimhaut des menschlichen Respirationstraktes. Die hier gefundenen Inhibitoren haben die Aufgabe, das Flimmerepithel von Nase und Bronchien gegen die proteolytische Aktivität von Bakterien zu schützen und eine Eigenverdauung des Epithels zu verhindern.

Der wesentliche Inhibitor aus dem menschlichen Nasensekret ist niedermolekular (Molekulargewicht 13000) und zeigt die interessante Eigenschaft, daß er bei verschiedenen Rhinopathien Konzentrationsschwankungen unterliegt, die ein Maß für den Krankheitsablauf sind (43). Der niedermolekulare Inhibitor aus menschlichem Bronchialsekret hat das gleiche Hemmspektrum wie derjenige aus menschlichem Nasensekret; deshalb wird eine gleiche Funktion dieses Inhibitors in der

gleichen Gewebsumgebung angenommen.

Unsere Aufgabe war es, einen ähnlichen oder möglicherweise den gleichen Inhibitor im Respirations-trakt von Rind und Schwein nachzuweisen.

III. Kapitel:

ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN VON PROTEINASEINHIBITOREN

1. Molekulargewicht von Proteinaseinhibitoren

Wir können nach dem Molekulargewicht zwei Gruppen von Inhibitoren unterscheiden:

- Niedermolekulare Inhibitoren mit einem Molekulargewicht von 6000 bis 13000. Zu dieser Gruppe von Inhibitoren gehören die meisten tierischen und menschlichen Enzymhemmer.
- Hochmolekulare Inhibitoren mit einem Molekulargewicht zwischen 13000 und 80000; sie finden sich vor allem in Pflanzen und Säugetiersera.

2. Chemische Struktur der Proteinaseinhibitoren

Proteinaseinhibitoren sind Polypeptide, Glycoproteide oder Proteine. Ihr Hemmzentrum besteht wahrscheinlich aus einer Lys-X- oder Arg-X-Bindung. Gültige Aussagen über ihr Hemmzentrum und den Hemmechanismus können heute noch nicht gemacht werden.

3. Stabilität der Proteinaseinhibitoren

Inhibitorhaltiges Lyophilisat kann bei Temperaturen zwischen 0 und 20°C etwa ein halbes Jahr aufbewahrt

werden, ohne daß durch eine Umstrukturierung des Hemmzentrums Aktivität verlorenght.

Im ph-Bereich von 3 bis 7 sind die Inhibitoren am hitzestabilsten, im alkalischen Milieu denaturieren fast alle Inhibitoren langsam aber spontan.

IV. Kapitel:

PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON PROTEINASEINHIBITOREN

1. Pflanzliche Inhibitoren

Fast alle Aussagen über die physiologische Bedeutung von Proteinaseinhibitoren der Pflanzen sind bis heute nicht mit letzter Klarheit bewiesen. Nur eine Tatsache scheint Gültigkeit zu haben: Alle Leguminosen haben Proteinaseinhibitoren; auf der anderen Seite leben alle Leguminosen in Symbiose mit Knöllchenbakterien. Die Vermutung liegt nahe, daß die Inhibitoren die Aufgabe haben, die Leguminosen vor Bakterienüberwucherung und der Wirkung der Bakterienproteasen zu schützen.

2. Tierische und menschliche Inhibitoren

Allgemeine Aufgaben der Proteinaseinhibitoren sind der Schutz gegen äußere Einflüsse und die zeitliche Begrenzung proteolytischer Vorgänge.

Beispiele für die angenommene Funktion von Proteinaseinhibitoren in:

- *Ascaris lumbricoides* suum: Schutz vor Verdauung durch den Wirtsorganismus (44).

- Ovomucoid: Schutzmechanismus während der Befruchtung des Eies.
- Colostrummilch der Mammalia: Inhibitoren haben die Aufgabe, die Immunkörper der Muttermilch vor dem tryptischen Abbau im Dünndarm zu schützen. Dadurch können die Immunkörper unversehrt in den kindlichen Kreislauf gelangen (45).
- Blutsera von Tier und Mensch: Die Inhibitoren des Blutserums sollen die pathologische Überaktivität proteolytischer Enzyme abfangen. Bei vielen Krankheiten finden wir einen erheblichen Anstieg des Seruminhibitorspiegels, z.B. nach Myocardinfarkt, nach chirurgischen Eingriffen (46), bei malignen Erkrankungen und bei schweren Infektionen (47,48, 49). Interessant ist die Tatsache, daß die Produktion der Inhibitoren genetisch festgelegt ist; bei rezessiv vererblichem Fehlen des α_1 -Globulininhibitors kommt es z.B. gehäuft zu Lungenemphysem (50,51) wegen mangelhaftem Schutz vor der Wirkung proteolytischer Enzyme.
- Rinderorgane: Wahrscheinlich besteht ein Zusammenhang zwischen der außergewöhnlichen Besiedlung des Rinderpansens durch Ciliaten (Wiederkäuer) und der allgemeinen Verbreitung von Proteinaseinhibitoren in Rinderorganen. Die Auseinandersetzung mit diesen und ihren Stoffwechselprodukten macht die Anwesenheit von Inhibitoren in vielen Rinderorganen notwendig (52).
- Pankreas von Tier und Mensch: Die Sekretion von Trypsin in der Pankreas erfolgt gleichzeitig und in konstanten Konzentrationsverhältnissen zur Sekretion des Trypsininhibitors. Einige Autoren nehmen an, daß die physiologische Bedeutung des Inhibitors

im Verhindern einer Autolyse des Pankreasgewebes durch die hier produzierten proteolytischen Enzyme besteht (53,54).

- Samenblasen und Sperma von Säugetieren und Mann: Wahrscheinlich wird durch die hier gefundenen Inhibitoren der Schutz der Genitalschleimhaut, lebensfähiger Spermienzellen und bereits befruchteter Eizellen vor der Wirkung der akrosomalen Hyaluronidase der Spermien gewährleistet (55).
- Schleimhaut der Atemwege von Mensch und Säugetier: Schutz der Schleimhaut gegen Proteasen von Bakterien und anderen Mikroorganismen (52).

V. Kapitel:

PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON PROTEINASEINHIBITOREN

1. Proteinaseinhibitoren in der Schocktherapie

Im Schock ist die Kininogenkonzentration im Blut durch Einwirkung von Kininogenase vermindert (56,57,58). Die Kininogenase kann durch Rinderinhibitor gehemmt werden. Bei toxischem Schock wird deshalb therapeutisch Rinderinhibitor verabreicht (59).

2. Proteinaseinhibitoren in der Therapie von Blutgerinnungsstörungen

- Bei primärer Hypofibrinogenämie: Der Inhibitor verbessert die Blutstillung (60).
- Bei sekundärer Hypofibrinogenämie: Die Fibrinolyse wird durch den Inhibitor aus Rinderorganen gehemmt (61,62,63).

3. Proteinaseinhibitoren in der Pankreatitistherapie

Zur Verhinderung einer frühzeitigen Aktivierung von Trypsinogen in der Pankreas wird Rinderinhibitor gegeben (64,65,66,67,68).

Von diesem Mechanismus abweichend vertreten einige Autoren eine andere Hypothese über die Wirkung von Rinderinhibitor bei Pankreatitis: Durch die primären entzündlichen Vorgänge in der Pankreas wird das Kininsystem zu verstärkter Produktion angeregt (69); dies führt zu Blutdruckkrisen, die rückwirkend den Krankheitsablauf verschlimmern.

Der Rinder-Trypsin-Kallikreininhibitor hemmt alle Enzyme des Kininsystems und verhindert somit die bei einer Pankreatitis häufigen Kreislaufzusammenbrüche (66,70,71,72).

In Deutschland wird die Therapie mit Proteinaseinhibitoren fast ausschließlich mit Trasylol durchgeführt; es handelt sich um ein Inhibitorkonzentrat aus Rinderlunge oder anderen Rinderorganen. Trasylol wird i.v. als Dauertropfinfusion appliziert, hat eine Halbwertszeit von 15 Minuten und ist nach 6 Tagen vollständig über die Nieren ausgeschieden.

2. A B S C H N I T T: EIGENE UNTERSUCHUNGEN⁺⁾

1. Kapitel:

TRACHEALSEKRET SCHWEIN

1. Voruntersuchungen

Das Sekret wird aus ca. 600 Wattetrachealabstrichen mit Boratpuffer eluiert. Die Gesamtmenge Eluat beträgt 550 ml.

Über den Trypsinhemmtest erhalten wir folgende Aussagen über den Inhibitorgehalt des in Boratpuffer gelösten Schweinetrachealsekretes:

- Eluat vor Dialyse: 18 ImU/ml
- Eluat nach Dialyse: 18 ImU/ml
- ImU im gesamten Eluat: 9900

Durch Lyophilisation erhalten wir 3200 mg Proteintrockenmasse. Wir stellen mit Hilfe des Trypsinhemmtestes fest:

- Aktivität des Lyophilisates: 2,36 ImU/mg
- Gesamtaktivität des Lyophilisates: 7550 ImU

2. Isolierung des Inhibitors aus Schweinetrachealsekret

Das gelöste Lyophilisat wird in zwei Portionen auf die Sephadex G-75-Säule aufgegeben.

⁺⁾ Die graphischen Darstellungen finden sich im Anhang

Ergebnisse:

	Frak. Ia ml	Frak. IIa ml	Frak. IIIa ml
1. Säulen- lauf	324	82	154
2. Säulen- lauf	338	100	150

Die Fraktion IIa hat einen klaren Gipfel der Inhibitoraktivität.

	Frak. Ia ImU/ml	Frak. IIa ImU/ml	Frak. IIIa ImU/ml
1. Säulen- lauf	3	12	4,3
2. Säulen- lauf	4	12	4,2

Die entsprechenden Fraktionen der beiden Säulenläufe werden vereinigt und dialysiert.

Erneute Austestung von Proben aus der Fraktion ergibt:

- Gesamt ImU in Frak. Ia: 1250 ImU/661 ml
- Gesamt ImU in Frak. IIa: 2420 ImU/182 ml
- Gesamt ImU in Frak. IIIa: 908 ImU/304 ml

3. Reindarstellung des Inhibitors aus den inhibitorhaltigen Fraktionen

Die inhibitorhaltigen Fraktionen IIa und IIIa werden lyophilisiert und getrennt auf die Sephadex G-75-

Säule aufgegeben. Die inhibitorhaltige Fraktion aus diesem Säulenlauf wird zur Unterscheidung von der aufgegebenen Fraktion IIa (s.o.) als Fraktion IIb bezeichnet.

Ergebnisse:

Frak.IIb ml	Frak.IIb ImU/ml		Frak.IIb Gesamt ImU
	vor Dialyse	nach Dialyse	
148	14,5	14,0	2291

Die Inhibitorfraktion IIb wird dialysiert, lyophilisiert und ausgetestet:

mg Lyophilisat	ImU/mg Lyoph.	ImU im Gesamtlyoph.
634	3,4	2150

Nach dem Säulenlauf der Fraktion IIIa war in dem Eluat keine Inhibitoraktivität mehr nachweisbar. Das Eluat wird verworfen.

4. Trypsinhemmkurve

Es werden 13 mg Lyophilisat der Fraktion IIb in 1ml Boratpuffer gelöst.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 4

Diskussion der Hemmkurve: Die Kurve verläuft bis zu einer ca. 85%-igen Hemmung linear. Zur vollständigen Hemmung ist ein Inhibitorüberschuß von rund 100 % notwendig.

5. Chymotrypsinhemmkurve

Es werden 10 mg Lyophilisat der Fraktion IIb in 1 ml Boratpuffer gelöst.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 5

Diskussion der Hemmkurve: Die Kurve verläuft bis zu einer ca. 70%-igen Hemmung linear. Zur absoluten Hemmung der Chymotrypsinaktivität ist ein ca. 100%-iger Inhibitorüberschuß notwendig.

6. Plasminhemmkurve

Es werden 10 mg Lyophilisat der Fraktion IIb in 1 ml Boratpuffer gelöst.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 6

Diskussion der Hemmkurve: Die Kurve verläuft in keinem Abschnitt linear. Absolute Hemmung des Plasmins durch den Inhibitor wird auch durch hohen Inhibitorüberschuß nicht erreicht.

7. Kallikreinhemmtest

Es werden ca. 8 ImU der Inhibitorlösung eingesetzt.

Ergebnisse:

Leerwert : $\Delta E = 141$

Vergleichswert: $\Delta E = 347$

Testwert : $\Delta E = 136$

Kallikrein wird in dem vorliegenden Konzentrationsverhältnis durch den Inhibitor aus Schweinetrachealsekret vollständig gehemmt.

8. Temporäre Hemmung

Es werden ca. 6,8 ImU Inhibitor und 10 EmU Trypsin eingesetzt.

Ergebnisse:

Leerwert $\Delta E = 32$

ΔE bei Versuchsbeginn = 1

ΔE nach einer Stunde = 1

ΔE nach drei Stunden = 26

ΔE nach fünf Stunden = 31

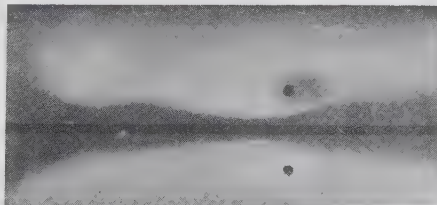
Nach fünf Stunden ist keine Inhibitorwirkung mehr nachweisbar; der Inhibitor ist durch das Trypsin abgebaut.

9. Fibrinagarelektrophorese

Der in unserer Versuchsanordnung erfolgte Vergleich des immunoelektrophoretischen Verhaltens der Inhibitoren aus Schweineserum und Schweinetrachealsekret ergibt folgendes Ergebnis:

Schweineserum

Schweine-
trachealsekret



Diskussion: Für das Schweineserum ergeben sich zwei deutlich unterscheidbare Inhibitoren; die Immunelektrophorese des Inhibitors aus Schweinetrachealsekret ergibt nur einen Inhibitor. Dieser entspricht in Wanderrichtung und Laufstrecke dem langsameren Inhibitor aus Schweineserum.

10. Bestimmung des Molekulargewichtes des Inhibitors aus Schweinetrachealsekret

Über untenstehende graphische Methode wird das Molekulargewicht des Inhibitors aus Schweinetrachealsekret mit 46.000 ermittelt.

Siehe Kurve Nr. 8

II. Kapitel:

TRACHEALSEKRET RIND

1. Voruntersuchungen

Es wurden ca. 650 Watteabstriche aus den Tracheen von Rindern entnommen. Das Eluat aus den Watteträgern (Elutionsmittel Boratpuffer) ergab ein Gesamtvolumen von 475 ml.

Durch Austesten finden wir folgende Inhibitoraktivität im Eluat:

- Eluat vor Dialyse: 19,5 ImU/ml
- Eluat nach Dialyse: 18,9 ImU/ml
- ImU im gesamten Eluat: 9000

Nach Lyophilisation erhalten wir 4700 mg Eiweiß= trockenmasse.

- Aktivität des Lyophilisates: 1,8 ImU/mg
- Gesamtaktivität des Lyophilisates: 8400 ImU

2. Isolierung des Inhibitors aus Rindertrachealsekret

Die Sephadex G-75-Säule wird mit drei Portionen des gelösten Lyophilisates beschickt.

Ergebnisse:

	Frak.Ia ml	Frak.IIa ml	Frak.IIIa ml
1. Säulenlauf	340	160	475
2. Säulenlauf	310	195	530
3. Säulenlauf	328	160	470

Ein Gipfel der Aktivität liegt in der Fraktion IIa. Die Fraktion IIIa weist eine nachweisbare, aber geschwächte Inhibitoraktivität auf.

	Frak Ia ImU/ml	Frak.IIa ImU/ml	Frak.IIIa ImU/ml
1. Säulenlauf	2,0	8,0	4,6
2. Säulenlauf	2,0	7,8	4,0
3. Säulenlauf	1,8	14,0	2,2

Die Austestung der Fraktionen nach Vereinigung der entsprechenden Fraktion aus den drei Säulenläufen nach Dialyse ergibt:

Gesamt ImU in Fraktion Ia : 940 ImU/978 ml
 Gesamt ImU in Fraktion IIa : 4881 ImU/515 ml
 Gesamt ImU in Fraktion IIIa : 1278 ImU/1475 ml

3. Reindarstellung des Inhibitors aus den inhibitorhaltigen Fraktionen

Die Fraktionen IIa und IIIa werden durch Druckdialyse eingeengt. Das Druckdialysat der Fraktion IIa (33,5 ml) und der Fraktion IIIa (37,5 ml) werden getrennt auf die Sephadex G-75-Säule aufgegeben.

Ergebnisse:

Frak.IIb ml	Frak.IIb ImU/ml		Frak.IIb Gesamt ImU
	vor Dialyse	nach Dialyse	
60	30	28,2	1800

Austestung der Fraktion IIb nach Dialyse und Lyophilisation ergibt:

mg Lyophilisat	ImU/mg Lyophil.	ImU im Gesamtlyoph.
166,8	9,9	1620

Von der Fraktion IIIa werden insgesamt 650 ImU aufgegeben. Nach dem Säulenlauf ist im Eluat keine Inhibitoraktivität nachweisbar.

4. Trypsinhemmkurve

10 mg Lyophilisat der Fraktion IIb werden in 1 ml Boratpuffer gelöst.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 13

Diskussion der Hemmkurve: Die Inhibitorwirkung ist bis zu einer ca. 95%-igen Hemmung dem Inhibitoreinsatz proportional. Zur vollständigen Hemmung des Enzyms ist ein etwa 100%-iger Inhibitorüberschuß notwendig.

5. Chymotrypsinhemmkurve

Der Inhibitor wird in einer Konzentration von 10 mg Lyophilisat auf 1 ml Boratpuffer eingesetzt.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 14

Diskussion der Hemmkurve: Bis zu einer 90%-igen Hemmung verläuft die Hemmkurve ideal. Eine absolute Hemmung wird allerdings auch durch sehr hohen Inhibitorüberschuß nicht erreicht.

6. Plasminhemmkurve

Gelöst werden 5 mg inhibitorhaltiges Lyophilisat in 1 ml Boratpuffer.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 15

Diskussion der Hemmkurve: Proportionalität zwischen eingesetzter Inhibitormenge und Hemmwirkung besteht bis zu einer 80%-igen Hemmung. Absolute Hemmung wird bei einem Einsatz von 35 ImU erreicht, also einem Inhibitorüberschuß von ca. 150 %.

7. Kallikreinhemmtest

Es werden ca. 20 ImU der Inhibitorlösung eingesetzt.

Ergebnisse:

Leerwert : $\Delta E = 81$

Vergleichswert: $\Delta E = 352$

Testwert : $\Delta E = 243$

Diskussion: Für die eingesetzte Inhibitormenge ergibt sich eine 40%-ige Hemmung des Kallikreins unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen.

8. Temporäre Hemmung

Eingesetzt werden 0,1 ml gelöstes Lyophilisat (ca. 51 ImU) und 1,3 ml Trypsinlösung (ca. 65 EmU).

Ergebnisse:

Leerwert $\Delta E = 141$

ΔE bei Versuchsbeginn = 3

ΔE nach 1 Stunde = 4

ΔE nach 3 Stunden = 30

ΔE nach 5 Stunden = 36

Die Hemmwirkung des Inhibitors aus Rindertrachealsekret ist nach 5 Stunden zu einem Drittel aufgehoben.

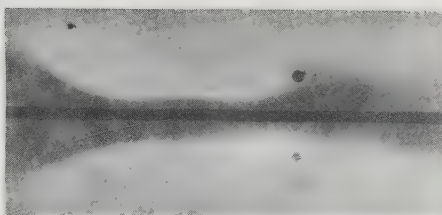
9. Fibrinagraelektrophorese

Wir vergleichen in unserer Versuchsanordnung das elektrophoretische Verhalten der Inhibitoren aus Rinderserum und Rindertrachealsekret.

Ergebnis:

Rinderserum

Rindertracheal-
sekret



Diskussion: Auch beim Rinderserum erhalten wir zwei getrennte Ausbuchtungen entlang der Wanderstrecke, die zwei unterschiedliche Inhibitoren anzeigen. Der Inhibitor mit der größeren Laufstrecke ist in seinen elektrophoretischen Eigenschaften mit dem Inhibitor aus Rindertrachealsekret identisch.

10. Molekulargewichtsbestimmung des Inhibitors aus Rindertrachealsekret

Gemäß untenstehender Auswertung ergibt sich für den Inhibitor aus Rindertrachealsekret ein Molekulargewicht von 49.600.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 17

III. Kapitel:

SERUM SCHWEIN

1. Voruntersuchungen

Durch Austestung des Schweineserums erhalten wir folgende Werte für den Inhibitorgehalt:

- Serum vor Dialyse: 260 ImU/ml
- Serum nach Dialyse: 250 ImU/ml

2. Isolierung des Inhibitors aus Schweineserum

Das dialysierte Serum wird in zwei Portionen auf die Sephadex G-75-Säule aufgegeben.

Ergebnisse:

	Aufgeg.ml Schweines.	Aufgeg.ImU Schweines.	Frak.I ml	Frak.II ml
1. Säulen- lauf	10	2600	466	302
2. Säulen- lauf	10	2600	440	280

Der Gipfel der Inhibitoraktivität liegt in der Fraktion II.

	Frak.II ImU/ml	Frak.II ImU/gesamt
1. Säulen- lauf	5,0	1812
2. Säulen- lauf	6,5	1820

Die Fraktion II der beiden Säulenläufe werden vereinigt und durch Druckdialyse eingeeengt.

Das Druckdialysat hat eine Inhibitoraktivität von 53 ImU/ml.

3. Trypsinhemmkurve

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 20

Diskussion der Hemmkurve: Bis zu ca. 70%-iger Hemmung verläuft die Hemmkurve linear. Absolute Hemmung des Enzyms wird selbst bei 10-fachem Inhibitorüberschuß nicht erreicht.

4. Chymotrypsinhemmkurve

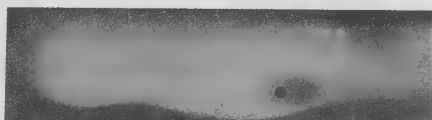
Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 21

Diskussion der Hemmkurve: Nach annähernd proportionalem Verlauf der Kurve bis zu 30%-iger Hemmung verläuft sie sehr unregelmäßig und nahezu horizontal. Absolute Hemmung wird auch bei 8-fachem Inhibitorüberschuß nicht erreicht.

5. Fibrinagarelektrophorese

Das Schweineserum enthält zwei verschiedene Inhibitoren mit unterschiedlichen Wandereigenschaften im elektrischen Feld.

Schweineserum



6. Molekulargewichtsbestimmung des Inhibitors aus Schweineserum

Die graphische Auswertung ergibt für den Inhibitor aus Schweineserum ein Molekulargewicht von ca.

52 000. Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 22

IV. Kapitel:

SERUM RIND

1. Voruntersuchungen

Die Inhibitoraktivität des Rinderserums beträgt:

- Serum vor Dialyse : 31 ImU/ml
- Serum nach Dialyse: 30 ImU/ml

2. Isolierung des Inhibitors aus Rinderserum

Es werden zwei Portionen dialysierten Rinderserums auf die Sephadex G-75-Säule aufgegeben.

Ergebnisse:

	Aufgeg.ml Rinderser.	Aufgeg.ImU Rinderser.	Frak.I ml	Frak.II ml
1. Säulen- lauf	10	3000	502	256
2. Säulen- lauf	10	3000	491	188

Die Fraktion der höchsten Inhibitoraktivität ist die Fraktion II.

	Frak.II ImU/ml	Frak.II ImU/gesamt
1. Säulen- lauf	8	2048
2. Säulen- lauf	9	1692

Die beiden Fraktionen II der Säulenläufe werden vereinigt und durch Druckdialyse eingeengt. Für das Druckdialysat ergibt sich eine Inhibitoraktivität von 49 ImU/ml.

3. Trypsinhemmkurve

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 25

Diskussion der Hemmkurve: Proportionalität zwischen eingesetzter Inhibitormenge und der durch den Inhibitor induzierten Hemmwirkung besteht bis zu einer ca. 70%-igen Hemmung des Trypsins. Bei sehr hohem Inhibitorüberschuß wird eine sehr starke, aber keine absolute Hemmung der Enzymaktivität erreicht.

4. Chymotrypsinhemmkurve

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 26

Diskussion der Hemmkurve: Die Kurve verläuft nur bis zu einer 25%-igen Hemmung ideal; dann bleibt sie nahezu horizontal und fällt bei hohem Inhibitorüberschuß langsam ab. Eine absolute Hemmung des Enzyms findet nicht statt.

5. Fibrinagarelektrophorese

Im elektrophoretischen Bild der Proteinaseinhibitoren aus Rinderserum unterschieden sich zwei Fraktionen, die in die gleiche Richtung, aber mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern.

Rinderserum



6. Molekulargewichtsbestimmung des Inhibitors aus Rinderserum

Wir erhalten als Ergebnis der graphischen Auswertung ein Molekulargewicht von 48.000 für den Inhibitor aus Rinderserum.

Ergebnis: Siehe Kurve Nr. 27

V. Kapitel:

UNTERSUCHUNG AUF HEMMAKTIVITÄT IN HOMOGENISATEN VON SCHLEIMHAUTGEWEBEN DER DARMABSCHNITTE DES SCHWEINES

Aufgrund des Vorkommens von Becherzellen in der Schleimhaut des Respirationstraktes und des Verdauungstraktes des Schweines interessiert uns die Frage, ob eine Inhibitoraktivität auch in den Darmabschnitten nachzuweisen ist.

Wir präparieren die Schleimhaut des Duodenums, Ileums, Coecums und Rectums aus Schweinedarm ab. Die Schleimhaut wird homogenisiert und dreifach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Ergebnisse Darmhomogenisate Schwein:

- Duodenum : 40,4 ImU/ml
- Ileum : 24,3 ImU/ml
- Coecum : 26,1 ImU/ml
- Rectum : 27,9 ImU/ml

Die Untersuchung des von der Darmschleimhaut heruntergeschabten mukösen Sekretes im Trypsinhemmtest ergibt folgende Inhibitoraktivität:

- Duodenum : 15 ImU/ml
- Ileum : 45 ImU/ml
- Rectum : 45 ImU/ml

Diskussion: Der Gipfel der Aktivität in den Gewebs-homogenisaten liegt im Duodenum; in den reinen Sekret-untersuchungen finden für die größte Hemmwirkung im Ileum und Rectum, wodurch die zahlreichen Becherzellen große Mengen mukösen Schleimes sezerniert werden.

3. A B S C H N I T T: MATERIAL UND METHODIK

I. Kapitel:

MATERIAL

1. Gewinnung des verwendeten Materials

Zur Untersuchung des Trachealsekretes von Rind und Schwein werden Watteträger auf langstieligen Klemmen befestigt.

Diese werden im Bereich unterhalb des Larynx bis zu 15 cm tief in die aufgeschnittenen Tracheen von herauspräparierten Respirationssitus eingeführt. Das benötigte Blut zur Untersuchung des Seruminhibitors wird aus den Halsschlagadern frisch geschlachteter Tiere entnommen. Das Serum als Ausgangsmaterial wird durch Abzentrifugieren gewonnen.

Bei den untersuchten Darmabschnitten vom Schwein wird die Schleimhaut sauber abpräpariert und homogenisiert. Als Ausgangsmaterial dient ein mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Homogenisat.

2. Schwierigkeiten des Materials

Bei der Gewinnung des Trachealsekretes vom Schwein ergibt sich aus dem Schlachtvorgang eine Schwierigkeit: Die getöteten Tiere werden etwa fünf Minuten in ein 60° C-Bad eingetaucht; dabei dringt häufig Flüssigkeit und Schmutz in die Trachea ein.

Daneben ist es schwierig, die bei der Schlachtung der Tiere in den interessierenden Abschnitten entstehenden Blutungen zu umgehen.

II. Kapitel:

METHODIK

1. Definition der internationalen Inhibitoreinheit

Die Definition der "Internationalen Inhibitoreinheit" ist eine Ableitung der Definition der "Internationalen Enzymeinheit".

Nach dem "Report of Enzym Commission" ist eine Enzymeinheit diejenige Menge eines Enzyms, die unter Standardbedingungen ein μMOL Substrat/Min umsetzt.

Nach Trautschold wird eine Enzymeinheit durch eine Inhibitoreinheit gehemmt.

Bei vielen Inhibitoren ist im Versuch eine proportionale Hemmung des Enzyms durch den Inhibitor nur bis zu einem bestimmten Konzentrationsverhältnis der beiden Antagonisten zu beobachten. Die Wirkung des über dieses Konzentrationsverhältnis hinaus eingesetzten Inhibitors (bei konstanter Enzymmenge) ist verschieden stark unterproportional.

Zweckmäßigerweise wird deswegen die Inhibitoreinheit auch so definiert:

Eine Inhibitoreinheit hemmt zwei Enzymeinheiten zu 50 %.

Im Bereich der 50%-igen Hemmung sind die Ergebnisse am genauesten.

2. Der Trypsinhemmtest

Zur Bestimmung der Anzahl Inhibitoreinheiten (IU) in einer Lösung ist der Trypsinhemmtest besonders geeignet. Trypsin wird von praktisch allen bekannten Proteinaseinhibitoren gehemmt.

a) Prinzip

Aus N-Benzoyl-Arginin-p-Nitroanilid (BAPNA) wird hydrolytisch p-Nitroanilin freigesetzt. Die Hydrolyse wird durch Trypsin katalysiert.

Die hydrolytische Wirksamkeit des Trypsin ist durch die Farbstoffeigenschaften des entstehenden p-Nitroanilin photometrisch meßbar.

Für konstante Mengen eingesetzten Trypsins und Substrates erhalten wir im Photometer eine konstante Extinktionsänderung.

In Anwesenheit von Inhibitor ist die Extinktionsänderung geringer. Die Verminderung der Extinktionsänderung ist dem Inhibitorgehalt des Ansatzes bis zu einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von Enzym zu Inhibitor proportional.

b) Reagenzien

- 0,2 m Triäthanolaminpuffer, pH 7,8 (mit Zusatz von Calciumionen)
- 100 mg BAPNA in 100 ml aqua dest.
- 5 mg Trypsin in 100 ml 10^{-3} nHCl.
- Inhibitorhaltige Lösung

c) Meßverfahren

Wir benutzen zur Messung ein Eppendorf-Photometer, der mit Licht der Wellenlänge 405 μm arbeitet. Die 3-ml-Glasküvetten des Photometers haben eine Schichtdicke von 1 cm.

Zur Bestimmung des Leerwertes werden sie wie folgt gefüllt:

- 0,2 ml Trypsinlösung
- 1,8 ml Triäthanolaminpuffer

Eine Minute Inkubation bei einer Temperatur von 25° C.

- Zugabe von 1,0 ml BAPNA.

Die Extinktionsänderung nach jeder Minute wird über drei Minuten am Photometer abgelesen. Zur Feststellung des Inhibitorgehaltes einer Lösung wird der Ansatz so verändert:

- 0,2 ml Trypsinlösung
- 0,1 - 1,8 ml Testlösung
- Triäthanolaminpuffer ad 2 ml

Eine Minute Inkubieren bei 25° C

- Zugabe von 1 ml BAPNA

d) Berechnungen

Aus Leerwert, Testwert, Menge des eingesetzten Trypsins und der eingesetzten Testlösung kann der Inhibitorgehalt der Testlösung berechnet werden. Dabei wird praktischerweise die Inhibitor miliunit (ImU) anstelle der Inhibitorunit benutzt.

$$\text{ImU/ml} = \frac{(a-b) \cdot c \cdot d}{a}$$

- a = Extinktionsänderung nur mit Trypsin (Leerwert)
- b = Extinktionsänderung des Testwertes (mit Trypsin und Inhibitor)
- c = Eingesetzte Trypsinmenge in γ
- d = Umrechnungsfaktor der Menge eingesetzter Testlösung auf einen Milliliter

Laut Definition gilt: Unter Standardbedingungen setzt eine Enzymeinheit 1 μMOL Substrat/Min. um. Das Substrat ist BAPNA, durch Enzymwirkung freigesetzter Farbstoff ist p-Nitroanilin.

Bei einem molaren Extinktionskoeffizienten des p-Nitroanilins von $9,95 \times 10^3 \left[\frac{1}{\text{MOL} \cdot \text{cm}} \right]$ entspricht eine EU einer Extinktionsänderung von 9,95 pro Minute und Milliliter. Für unseren auf 3 ml verdünnten Substratansatz ergibt sich für eine eingesetzte EmU eine Extinktionsänderung von 0,00332 pro Min. Durch ein $\mu\text{gr.}$ des von uns verwandten Trypsins wird eine Extinktionsänderung von 0,003 - 0,0035/Min. hervorgerufen. 1 $\mu\text{gr.}$ Trypsin entspricht also etwa einer EmU.

e) Meßgenauigkeit

Die Meßergebnisse werden auch durch die Anwesenheit großer Mengen Fremdeiweiß nicht beeinflusst. Die eingesetzte Menge Trypsin kann zwischen 1 $\mu\text{gr.}$ und 20 $\mu\text{gr.}$ schwanken, ohne daß die Empfindlichkeit nachläßt.

Die Menge des eingesetzten Boratpuffers als Lösungsmittel für den Inhibitor geht nachhaltig in die Meßergebnisse ein. Hohe Mengen Boratpuffer erzeugen eine wesentlich geringere Extinktionsänderung für Leerwert und Testwert.

3. Arbeitsgänge zur Isolierung des Inhibitors

a) Gewinnung einer ungereinigten Lösung des Inhibitors

Das Trachealsekret von Rind und Schwein wird aus den Wattetupfern mit 0,05 M Boratpuffer, pH 7,8, eluiert. Feste Organteile wie die Darmabschnitte vom Schwein werden im Homogenisator zerkleinert und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Danach werden feste Bestandteile abzentrifugiert.

b) Voruntersuchung und Einengen des Inhibitors

Das so gewonnene Rinder- und Trachealsekret in Boratpuffer wird im Trypsinhemmtest auf seinen Inhibitorgehalt geprüft. Dann wird das Ausgangsmaterial im Dialyseschlauch 12 Stunden mit Leitungswasser dialysiert und salzfrei gemacht. Der anschließende Trypsinhemmtest mit dem Dialysat gibt Aufschluß über eventuelle Inhibitoraktivitätsverluste durch die Dialyse.

Jetzt wird das salzfreie Sekret lyophilisiert. Zur Weiteruntersuchung wird das Lyophilisat wieder in entsprechenden Mengen Boratpuffer gelöst. Als zweite Methode wurde von uns die Druckdialyse mit der Membran Amicon UM 2 gewählt. Dadurch wird eine Konzentrationserhöhung des Inhibitors um das 5-10-fache erreicht.

c) Die Sephadex G-75-Säule

Die Säulen messen 220 x 2,7 cm. Sie werden mit Sephadex G-75 beschickt.
Das Sephadex G-75 wirkt als Molekularsieb:

die großen Moleküle werden schneller eluiert; je kleiner ein Molekül ist, desto später erscheint es im Eluat. Elutionspuffer ist 0,05 m Boratpuffer, ph 8,2.

Das Eluat wird in einem Fraktiometer aufgefangen und in einem Uvicord mit selbsttätigem Schreiber laufend auf den Proteingehalt überprüft.

d) Eichung der Säule und Bestimmung von Molekulargewichten

Jede Säule hat ein bestimmtes Innenvolumen. Man kann es bestimmen durch das Aufgeben einer sehr hochmolekularen Substanz (z.B. γ -Globulin). Diese Substanz wird durch das Molekularsieb nicht retentiert. Die Gesamtmenge Eluat, die bis zum Erscheinen der hochmolekularen Substanz aus der Säule läuft, entspricht dem sog. Innenvolumen der Säule.

Zwei weitere Substanzen (Chymotrypsinogen und Cytochrom c) mit bekanntem Molekulargewicht werden aufgegeben. Sie erscheinen - durch das Molekularsieb des Säuleninhaltes verschieden stark zurückgehalten - in immer derselben Fraktion des Eluates.

Die Anzahl von Millilitern Eluat bis zum Erscheinen derselben Substanz in der Elutionsflüssigkeit ist für ein und dieselbe Säule konstant.

Eine Substanz mit unbekanntem Molekulargewicht wird nun nach einer von ihrer Molekülgröße abhängigen Anzahl Milliliter im Eluat nachweisbar sein.

Zur graphischen Bestimmung des unbekannten Molekulargewichtes sind folgende vier Werte notwendig:

Die Anzahl der Milliliter bis zum Auftauchen der drei Eichsubstanzen und der Substanz mit dem unbekannten Molekulargewicht in dem Eluat einer Säule.

Zur Auswertung wird der Quotient aus dem Volumen vor dem Erscheinen des Chymotrypsinogens und des Cytochroms c einerseits und dem Innenvolumen andererseits ermittelt. In einem Koordinatensystem (y-Achse = Quotient; x-Achse = Molekulargewicht) werden beide Quotienten entsprechend ihrem Molekulargewicht eingetragen. Die beiden Punkte, die man so erhält, werden durch eine Gerade miteinander verbunden.

Analog wird der Quotient für den Inhibitor errechnet, und der Wert auf der y-Achse desselben Koordinatensystems aufgetragen. Eine Parallele zur x-Achse durch diesen Punkt schneidet die oben gefundene Gerade; eine Senkrechte auf der x-Achse durch diesen Schnittpunkt zeigt auf der Abszisse das unbekannte Molekulargewicht an.

4. Der Chymotrypsinhemmtest

a) Prinzip

Aus Succinyl-phenylanilin-p-nitroanilid (SUPHEPA) wird enzymatisch durch Chymotrypsin der gelbe Farbstoff p-Nitroanilin freigesetzt. Die Menge des entstandenen Farbstoffes kann direkt im Photometer bei 405 μm bestimmt werden. Sie ist ein Maß für die zugegebene Menge Chymotrypsin.

b) Reagenzien

- 0,2 m Triäthanolaminpuffer, ph 7,8
- 50 mg SUPHEPA in 10 ml Puffer
- 1 mg Chymotrypsin in 10 ml 10^{-3} n HCl
- Inhibitorhaltige Testlösung

c) Meßverfahren

Die 3-ml-Küvetten des Photometers werden wie folgt angesetzt:

Zur Ermittlung der Autohydrolyse des Substrates (Leerwert)

- 2 ml Triäthanolaminpuffer
- 1 ml SUPHEPA

Zur Ermittlung der ungehemmten Hydrolyse des Substrates durch Chymotrypsin (Vergleichswert)

- 0,05 - 0,4 ml (5 - 40 μ gr) Chymotrypsinlösung
- Auffüllung mit Triäthanolaminpuffer ad 2 ml
- Starten der Reaktion nach einminütiger Inkubation durch Zugabe von 1 ml Substrat

Zur Ermittlung der durch den Inhibitor gehemmten, enzymatisch katalysierten Hydrolyse des Substrates (Testwert)

- 0,05 - 0,4 ml Chymotrypsinlösung
- geeignete Menge inhibitorhaltige Lösung
- Auffüllen ad 2 ml mit Triäthanolaminpuffer
- Starten der Reaktion nach einminütiger Inkubation nach Zugabe von 1 ml Substrat

Sofort danach und alle halbe Stunde über drei Stunden wird die Extinktionsänderung im Photometer abgelesen. (Wellenlänge des durchstrahlenden Lichtes: 405 μ m)

Auch hier gilt: 1 EmU bewirkt eine Extinktionsänderung von 0,00332/Min. Ein μ gr. Chymotrypsin erzeugt durch Substrathydrolyse aber nur eine Extinktionsänderung von 0,00015 - 0,00018/Min. im 3-ml-Ansatz. Eine EmU entspricht also etwa 20 μ gr. Chymotrypsin.

d) Berechnungen

Die Berechnung der Inhibitoraktivität wird nach der vom Trypsinhemmtest bekannten Formel durchgeführt:

$$\text{ImU/ml} = \frac{(a-b) \cdot e \cdot d}{a}$$

Statt des Umrechnungsfaktors für Trypsin wird der für Chymotrypsin (e) eingesetzt.

Von dem in die Formel eingesetzten Vergleichswert und Testwert muß die Extinktionsänderung subtrahiert sein, die durch die Autohydrolyse des Substrates (Leerwert) hervorgerufen wurde.

e) Meßgenauigkeit

Für uns ist nur der Bereich interessant, in dem die zugegebene Menge Enzym der Enzymwirkung proportional ist. Für unseren Ansatz ist das der Bereich von 5 - 40 μ gr. eingesetzten Chymotrypsins.

Die Ergebnisse sind auch bei wechselnder Menge von Fremdeiweiß im Ansatz reproduzierbar.

5. Der Kallikreinhemmtest

a) Prinzip

Das Substrat N-Benzoyl-L-Arginin-Äthylester (BAEE) wird durch die Enzymwirkung des Kallikrein gespalten.

Der dabei freiwerdende Äthylalkohol wird unter Einwirkung der Alkoholdehydrogenase dehydrogeniert. Das in den Reaktionsraum eingebrachte NAD wird zu NADH^+ hydrogeniert. Die Entstehung von NADH^+ wird bei 366 μm im Photometer direkt verfolgt. Die abgelesene Extinktionsänderung ist ein Maß für die kallikreinkatalysierte Spaltung des Substrates.

b) Reagenzien

- 15,2 gr. Natriumpyrophosphat
- 4,1 gr. Semicarbacid
- 0,9 gr. Glycin

Diese Substanzen werden in 400 ml aqua bidest. gelöst. Der ph von 8,7 wird mit starker Natriumbase eingestellt. Danach wird mit H_2O ad 500 ml aufgefüllt.

- Hochkonzentrierte, gutgekühlte ADH-Lösung
- Lösung von 100 mg NAD in 5 ml aqua bidest.
- Lösung von 10 mg BAEE in 10 ml aqua bidest.
- Lösung von 1 KE (biologische Kallikreineinheit) in 1 ml aqua bidest.

c) Ansätze

Vor Beginn des Testes werden folgende Lösungen vorbereitet:

- Lösung für den Vergleichswert: 0,1 ml der Kallikreinlösung werden in 0,9 ml Triäthanolaminpuffer eingebracht
- Lösung für die Testwerte: zu 0,1 ml der Kallikreinlösung wird so viel Inhibitorlösung zugegeben, daß sich eine 30-50%-ige Hemmung des Enzyms ergibt. Dann wird mit Triäthanolaminpuffer ad 1 ml aufgefüllt.

d) Meßverfahren

Die 6 Küvetten des Photometers werden wie nachstehend gefüllt:

1. Küvette: 2,4 ml Pyrophosphatpuffer + 0,02 ml ADH + 0,1 ml NAD + 0,5 ml BAEE
2. - 6. Küvette: 2,3 ml Pyrophosphatpuffer + 0,02 ml ADH + 0,1 ml NAD + 0,5 ml BAEE

Die Küvetten werden 5 Minuten bei 25° C inkubiert.

Mit der ersten Küvette wird die Spontanverseifung des Substrates gemessen. In diese Leerwertküvette wird keine Kallikrein- oder Inhibitorlösung eingebracht.

In die 2. Küvette wird 0,1 ml der unter c) aufgeführten Lösung für den Vergleichswert eingebracht.

Die Küvetten 3-6 werden mit qualitativ unterschiedlichen Lösungen für Testwerte beschickt (siehe 5c).

Jetzt wird wieder bei 25° C 2 Minuten lang inkubiert. Dann werden die Extinktionswerte der 6 Küvetten abgelesen. Nach 10 Minuten erfolgt die zweite Messung.

e) Berechnungen

Von den gefundenen Extinktionsänderungen/10 Min. für Vergleichswert und Testwerte muß die Extinktionsänderung durch Spontanverseifung des Substrates (1. Küvette) abgezogen werden.

Für Kallikrein gilt: Eine Extinktionsänderung von 0,11/10 Min entspricht dem Einsatz von 10 EmU Kallikrein in der Vergleichslösung. Trautschold zufolge gilt für die inhibitorhaltigen Hemmansätze:

Eine Verringerung der Extinktionsänderung (des Vergleichswertes) um 0,11/10 Min entspricht dem Einsatz von 10 ImU Inhibitor in einem Ansatz für einen Testwert.

f) Meßgenauigkeit

Die Extinktionsänderung nimmt in dem angegebenen Testverfahren nur bis zu 11 EmU eingesetzten Kallikreins proportional zu. Der untere Grenzwert der Proportionalität wird bei Einsatz von 5 EmU Enzym erreicht. 0,1 KE erzeugen ca. 10 EmU Kallikrein.

Testlösungen, die eine große Menge Fremdeiweiß enthalten, müssen im biologischen Kallikreintest (blutdrucksenkende Wirkung beim Hund) ausgewertet werden.

6. Der Plasminhemmtest

a) Prinzip

Auch Plasmin spaltet aus N-benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid den Farbstoff P-nitroanilin ab. Die Testanordnung entspricht daher derjenigen des Trypsinhemmtestes.

b) Reagenzien

- 2,5 mg Novo-Plasmin gelöst in 2 ml aqua bidest.
- 0,2 ml Triäthanolaminpuffer, ph 7,8 (ohne Ca^{++})
- Lösung von 100 mg BAPNA in 100 ml aqua bidest.
- inhibitorhaltige Lösung (10 mg Lyophilisat/1 ml Boratpuffer)

c) Meßverfahren

- 0,2 ml Plasminlösung (0,3 Novo-Einheiten Plasmin)
- 0,05 - 0,5 ml Inhibitorlösung
- Auffüllen ad 2 ml mit Triäthanolaminpuffer
- 10 Minuten bei 25° C inkubieren und Starten der Reaktion durch Zusatz von 1 ml BAPNA-Lösung

Das erste Ablesen der Extinktion erfolgt direkt nach dem Starten der Reaktion; die Extinktionsänderung im Vergleich zu diesem Anfangswert wird nach 10 Min. festgestellt.

Gemessen wird bei einem Licht der Wellenlänge von 405 μm .

d) Berechnungen

Die Berechnung der Anzahl ImU in der Testlösung erfolgt nach der beim Trypsinhemmtest angegebenen Methode.

7. Die Fibrinagarelektrophorese

a) Prinzip

Jedes Protein hat aufgrund einer großen Zahl geladener Molekülabschnitte entweder eine positive oder negative Summe aller elektrostatischen Ladungen. Die Gesamtladung läßt ein Protein unter geeigneten Bedingungen in einem elektrischen Feld zu einer der beiden Elektroden wandern. Die Wanderrichtung ist von der Ladung des Proteins und vom pH des Elektrophoresepuffers abhängig.

Die Wandergeschwindigkeit des Proteins hingegen ist eine Funktion der :

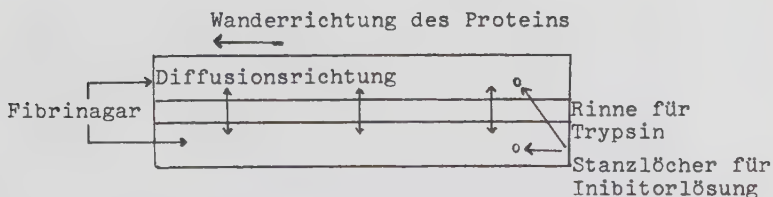
- Größe des Moleküls
- Größe der Ladung des Moleküls
- Gestalt des Moleküls (Reibung)

So erreicht jedes Protein nach einer bestimmten Zeit auf dem Trägermaterial einen für dieses Protein charakteristischen Punkt.

Zur Fixierung dieses Punktes auf dem Trägermaterial verwenden wir Trypsin; dieses wird in den Fibrinagar hineindiffundieren gelassen und es verdaut das Fibrin in dem Diffusionsbereich.

Wo sich der elektrophoretisch gewanderte Inhibitor in dem Fibrinagar befindet, bleibt die Verdauung des Fibrins aus: Die zurückgelegte Wanderungsstrecke des Inhibitors wird klar sichtbar.

Beispiel eines Objektträgers für Fibrinagarelektrophorese:



b) Reagenzien und Material

- Lösung von 40 mg Rinderfibrinogen in 10 ml Diäthylbarbitursäurepuffer, pH 8,2
- Lösung von 1,5 gr. Reinaragar in 100 ml aqua dest.

- 2,5 mg. Trypsin in 100 ml aqua bidest. gelöst
- in Boratpuffer gelöstes inhibitorhaltiges Lyophilisat
- frisch abzentrifugiertes Blutserum
- Elektrophoresepuffer ph 8,2, nach Michaelis: 19,42 g Natriumacetat und 29,42 g diäthylbarbitursaures Natrium werden in einem Liter aqua bidest. gelöst. 8 Teile Stammlösung + 9,6 Teile aqua dest. mit 0,1 n HCl auf ph 8,2 einstellen (Ionenstärke: 0,15). Ein Teil der Lösung und zwei Teile aqua dest. ergibt eine Ionenstärke von 0,05.

c) Herstellen der Fibrinagarplatten

Die Fibrin- und die Agarlösung werden auf 55° C erhitzt und 27 ml Agar- mit 6 ml Fibrinlösung vereinigt. Dazu kommen Kalziumionen. Jeweils 3 ml der Fibrinagarlösung werden auf einen Objektträger aufgegeben. Nachdem das Trägermaterial erstarrt ist (5 Min.), werden die Objektträger eine Stunde lang jeweils bei 80° C in einen Inkubator gelegt. Dann werden die Rinnen und Löcher zur Aufnahme der Trypsin- und der Inhibitorlösung gestanzt.

d) Durchführung der Elektrophorese

In die Stanzlöcher der Fibrinagarplatten wird mit der Mikropipette auf der einen Seite der Rinne 2 µl Serum und auf der anderen Seite 4-6 µl einer Inhibitorlösung eingebracht; so hat man auf demselben Objektträger den Vergleich zwischen den Wandereigenschaften der bekannten Seruminhhibitoren und anderer, unbekannter Inhibitoren.

Das Protein in den Lösungen wird mit Bromphenolblau sichtbar gemacht.

Die Elektrophoresekammer wird mit konstanten 80 mA und 110 - 150 V Gleichspannung betrieben.

Eine ausreichende Laufstrecke ist unter unseren Bedingungen nach 220 Min. zurückgelegt.

Jetzt werden die Rinnen der Objektträger randvoll mit Trypsinlösung gefüllt. Während 15 Stunden in einer Feuchtigkeitskammer bei 37° C diffundiert das Trypsin in das Trägermaterial.

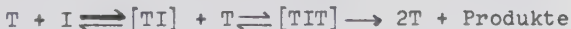
Das Ergebnis der Elektrophorese wird auf photographischem Papier festgehalten.

8. Die Temporäre Hemmung

a) Allgemeines

Als Temporäre Hemmung wird die Eigenschaft fast aller Trypsininhibitoren bezeichnet, nach einer bestimmten Zeit, durch das Enzym, das sie hemmen, verdaut zu werden. Diese Beobachtung wurde erstmals von Laskowski und Wu beschrieben. (74)

Sie beschreiben folgendes: Ein rascher Abbau des Inhibitors durch das Enzym (5-7 Stunden) ist nur erreichbar, wenn die Anzahl der Inhibitormoleküle im Reaktionsraum wesentlich (ca. 1/3) unter der Anzahl der Enzymmoleküle liegt. Schon bei geringem Inhibitorüberschuß dauert der Abbau unverhältnismäßig lange (1-2 Tage). Laskowski und Wu erklären das mit einer hypothetischen Gleichung:



Sie nahmen an, daß erst im Trypsin-Inhibitor-Komplex eines freien Trypsinmoleküls die Lysyl- und Arginylbindungen im Inhibitor-Molekül aufbrechen kann. Der Komplex bildet sich aber in Sekundenschnelle. Ergo: Wenn Trypsin nicht im Überschuß vorliegt, ist fast alles Enzym an den Inhibitor gebunden, und kein freies Trypsinmolekül zur Inhibitorspaltung im Reaktionsraum vorhanden; dadurch verläuft der Abbau sehr langsam.

b) Messung der Temporären Hemmung

Der normale Testansatz für einen Trypsin-Hemmtest wird modifiziert: Es wird eine solche Menge Trypsinlösung eingesetzt, daß die Anzahl der Enzymeinheiten um etwa 30 % höher liegt als die der Inhibitoreinheiten.

Die Ansätze in den Photometerküvetten werden bei 37° C inkubiert. Es wird die ungehemmte Enzymaktivität des Trypsins in einem Leerwert und die gehemmte in den Testwerten nach einminütiger Inkubation gemessen.

Nach einer Stunde und nach der dritten und fünften Stunde wird die Messung wiederholt.

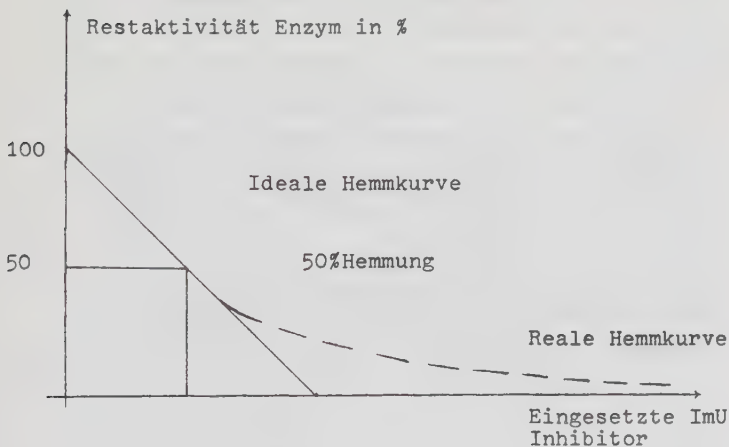
Liegt das Phänomen der temporären Hemmung vor, so ist unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen nach spätestens 5 Stunden keine oder nur wenig Hemmwirkung des Inhibitors nachweisbar.

Die Ergebnisse werden in einem Diagramm festgehalten: Auf der Abszisse wird die Zeit seit Reaktionsbeginn in Stunden aufgetragen; auf der Ordinate wird die dem Zeitpunkt entsprechende Restaktivität des Trypsins in % festgehalten.

9. Die Hemmkurve und das Hemmspektrum

Zur Gewinnung einer Hemmkurve setzen wir zu einer konstanten Enzymmenge steigende Inhibitormengen zu. Es wird die verbleibende Aktivität des Enzyms nach unterschiedlicher Inhibitorzugabe gemessen und in einem Koordinatensystem aufgetragen.

Beispiel einer realen und einer idealen Hemmkurve:



Eine ideale Hemmkurve entstünde, wenn sich in jedem Konzentrationsverhältnis von Enzym zu Inhibitor eine Proportionalität zwischen eingesetzter Inhibitormenge und ihrer Wirkung ergeben würde; das ist aber fast nie der Fall.

Deshalb ist der im unteren Teil abgeflachte Verlauf der Hemmkurve die Regel. Er zeigt einen überproportionalen Inhibitoreinsatz an, der notwendig ist, um die gleiche Hemmwirkung wie im oberen Abschnitt der Kurve zu erreichen.

Um einen Inhibitor klar zu charakterisieren, fertigen wir eine Reihe von Hemmkurven an; wir erhalten sie durch Austesten eines Inhibitors gegenüber verschiedenen Enzymen, z.B. Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin. Außerdem wird noch die Hemmwirkung auf Kallikrein geprüft und auf temporäre Hemmung untersucht.

Wenn alle diese Ergebnisse zusammengefaßt werden, ergibt sich ein für jeden Inhibitor charakteristisches Hemmspektrum. In diesem kommt zum Ausdruck, daß:

- ein Inhibitor nur bestimmte Enzyme hemmt.
- verschiedene Inhibitoren - um die gleiche Hemmwirkung bei einem Enzym zu erreichen - in verschiedener, charakteristischer Konzentration eingesetzt werden müssen.
- nicht jeder Inhibitor, bei einem sonst hemmbaren Enzym, in starkem Überschuß eine absolute Hemmung erreichen kann.

IV. A B S C H N I T T: ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

1. Kapitel:

ZUSAMMENFASSUNG

1. Trachealsekret Schwein

Wir finden einen Inhibitor, der folgende Eigenschaften hat:

- Vollständige Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein.
- Teilweise Hemmung von Plasmin.
- Vollständiger Abbau durch Trypsin nach fünfstündiger Inkubation.
- Gleiche Wandergeschwindigkeit und -richtung wie ein Inhibitor aus Schweineserum in der Fibrinagarelektrophorese.
- Ein Molekulargewicht von ca. 46 000

2. Serum Schwein

Für den Inhibitor aus Schweineserum ergaben sich nachstehende Charakteristika:

- Starke Trypsinhemmung.
- Schwächere Chymotrypsinhemmung
- Abtrennung von zwei verschiedenen Inhibitoren in der Fibrinagarelektrophorese.
- Molekulargewicht ca. 52 000.

3. Trachealsekret Rind

Für den Inhibitor aus Rindertrachealsekret ergab sich:

- Eine sehr starke Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin.
- Eine unvollständige, aber immer noch starke Hemmung von Kallikrein.
- Eine unvollständige Aufhebung der Inhibitorwirkung nach fünfstündiger Inkubation des Inhibitors mit Trypsin.
- In der Fibrinagarelektrophorese hat der Inhibitor aus Rindertrachealsekret die gleiche Wanderrichtung und -geschwindigkeit wie ein Inhibitor aus Rinderserum.
- Das Molekulargewicht liegt bei ca. 50 000.

4. Serum Rind

Der Inhibitor aus Rinderserum hat untenstehende Eigenschaften:

- Starke Hemmung von Trypsin.
- Schwächere Hemmung von Chymotrypsin.
- In der Fibrinagarelektrophorese lassen sich zwei verschiedene Inhibitoren voneinander unterscheiden.
- Das Molekulargewicht des Inhibitors aus Rinderserum beträgt ca. 48 000.

II. Kapitel:

DISKUSSION

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen der Inhibitoren aus Schweinetrachealsekret und Schweineserum zeigen Übereinstimmung in folgenden Punkten:

- Beide hemmen Trypsin und Chymotrypsin.
- Die elektrophoretischen Eigenschaften sind die gleichen.
- Das Molekulargewicht ist annähernd das gleiche.

Aufgrund dieser Ergebnisse darf angenommen werden, daß der von uns in Schweinetrachealsekret gefundene Inhibitor mit dem α_1 -Antitrypsin aus der α_1 -Globulinfraktion des Schweineserums identisch ist.

Auch der Inhibitor aus Rindertrachealsekret zeigt auffällige Ähnlichkeiten mit demjenigen aus Rinderserum:

- Beide hemmen Trypsin und Chymotrypsin.
- Gleiches Bild für beide Inhibitoren in der Fibrinagarelektrophorese.
- Das Molekulargewicht der Inhibitoren stimmt größenordnungsmäßig überein.

Auch beim Rind liegt offensichtlich im Trachealsekret der gleiche Inhibitor wie im Serum vor. Dieser Inhibitor gehört ebenfalls zur α_1 -Globulinfraktion des Rinderserums und wird als α_1 -Antitrypsin bezeichnet.

Ein ähnlicher wie der von Reichert, Hochstraßer und Mitarbeitern (73) gefundene niedermolekulare Inhibitor aus Bronchialsekret des Menschen konnte im Trachealsekret von Rind und Schwein nicht nachgewiesen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Weinland, E.: Z.Biol., 44, 1 (1903)
- (2) Kraut, H., E.K.Frey, E.Werle: Z.Physiol.Chemie, 192, 1 (1930)
- (3) Kunitz, M., J.H.Northop: J.Gen.Physiol. 19, 991 (1936)
- (4) Ham, W.E., Sandstedt, R.M.: J.Biol.Chemie, 154 (1944), 505
- (5) Kunitz, M.: Science 101, 668 (1945)
- (6) Werle, E., L. Maier, F.Löffler: Biochem.Z. 321 (1951), 372
- (7) Belolhwak, L.: Ber. Getreidechemiker-Tagung, Detmold 1964, S.19
- (8) Shyamala, G., B.M. Kennedy, R.L.Lyman: Nature 192 (1961), 360
- (9) Shyamala, G., R.L.Lyman: Canad.J.Biochem., 42 (1964), 1825
- (10) Laskowski, M.: In: S.P.Colowick; M.O.Kaplan, Methods of Enzymology, II, 1955, 36
- (11) Collier, H.B.: Canad.J.Res. 19 B (1941), 90
- (12) Green, N.M.: Biochem.J., 66 (1957), 416
- (13) Peanasky, R.J., M. Laskowski: Biochem.biophys. Acta, 37 (1960), 167
- (14) Peanasky, R.J.: Fed.Proc. 22 (1963), 246
- (15) Werle, E.L., L. Maier, E.Ringelmann: Naturwissenschaften, 39 (1952), 328
- (16) Laskowski, M., M.Laskowski jr.: In: M.L.Anson, K. Bailey, J.T.Edsall, Advances in Protein Chemistry IX (1954), 203
- (17) Green, N.M., H.Neurath: In: H.Neurath, K.Bailey, The Proteins, N.Y. IIB (1954), 1160

- (18) Desnuelle, P.: In: P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, The Enzymes, Bd. IV, (1960), S. 128
- (19) Laskowski, M. jr., M. Laskowski: J. biol. Chem. 190 (1951), 563
- (20) Jacobsson, K.: Scand. J. clin. Lab. Invest., 7 (1955), 57 Suppl. 14
- (21) Schultze, H. E., J. Göllner, K. Heide, M. Schönberger, G. Schwick: Z. Naturforschung 10b (1955), 463
- (22) Mansfeld, V., M. Rybak, Z. Horakova, J. Hladovec: Z. physiol. Chem. 318 (1960), 6
- (23) Moll, F. C., S. F. Sunden, J. R. Brown: J. biol. Chem. 233 (1958), 121
- (24) Martin, C. J.: J. biol. Chem., 237 (1962), 2099
- (25) Martin, C. J., A. R. Frazier: J. biol. Chem. 236 (1961), 2672
- (26) Webster, M. E., I. V. Pierce: J. Pharmacol. exp. Ther., 130 (1960), 486
- (27) Sale, E. F., S. G. Priest, H. Jensen: J. biol. Chem., 227 (1957), 83
- (28) Wu, F. C., M. Laskowski: J. biol. Chem., 235 (1960), 1680
- (29) Astrup, T., I. Sterndorff: Scand. J. clinic. Lab. Invest., 7 (1955) 239
- (30) Kunitz, M., J. II. Northop: J. gen. Physiol., 19 (1936), 991
- (31) Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle: Z. physiol. Chem., 192 (1930), 1
- (32) Werle, E., J. Däumer: Biochem. Z., 304 (1940), 377
- (33) Frey, E. K., H. Kraut, E. Werle: Kallikrein (Padutin), Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart 1950
- (34) Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle: Z. physiol. Chem., 192 (1930), 1

- (35) Werle, E.: 2. Int. Kongr., Brüssel, 1956
- (36) Werle, E., J. Trautschold: Münchn. Med. Wschr., 103 (1961), 713
- (37) Astrup, T.: Acta physiol. scand., 26 (1952), 243
- (38) Grossmann, M. J.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 99 (1958), 304
- (39) Siekevitz, P., G. E. Palade: J. biophys. biochem. Cytol., 4 (1958), 203
- (40) Trautschold, J., E. Werle, H. Haendle, H. Sebening: Z. physiol. Chem. 332 (1963), 328
- (41) Haendle, H.; Dissertation Med. Fak. Univ. München 1966
- (42) Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle: Z. physiol. Chem., 343 (1965), 185
- (43) Hochstraßer, K., E. Werle, Reichert: Hoppe Seylersche Z. Physiol. Chemie, 353, S. 221-226, Feb. 1972
- (44) Weinland, E.: Z. Biol., 44 (1903), 1
- (45) Schneider, I., J. Szathmary: Z. Immunitätsforsch., 98 (1940), 24
- (46) Tsitouris, G., S. Bellet, R. Eilberg, L. Feinberg, H. Sandberg: Arch. intern. Med., 108 (1961), 208
- (47) Nilsson, J. M., S. E. Bjorkman, L. Anderson: Acta med. scand., 170 (1961), 487
- (48) Paraskevas, M. I., M. Nilsson, G. Martinson: Scand. J. clin. Lab. Invest., 14 (1962), 138
- (49) Corell, J. T., A. Sjoerdsma: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 111 (1962), 274
- (50) Laurell, C. B., S. Eriksson: Clin. Chem. Acta, 11 (1965), 395
- (51) Eriksson, S.: Acta med. scand., 177 (1965), Suppl. 432

- (52) Vogel,R., J.Trautschold, E.Werle: Natürliche Proteinaseinhibitoren, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1966
- (53) Werle,E., J.Trautschold, H.Sebening, H.Fritz, M.Hutzel: Verh.Dtsch.Ges.inn.Med., 70 Kongr., 1964, S.801
- (54) Fritz,H., J. Trautschold, G.Hartwich, E.Werle: Fed.europ.Biochem. Soc.II Meeting, Wien 1965
- (55) Allison,A., Sci.Americ., 5, 242 (1967)
- (56) Forell,M.M.: Gastroenterologia (Basel), 84 (1955), 225
- (57) Walford,R.L., B.Kickhöfen: Arch.Biochem., 98 (1962),191
- (58) Meyer,A.: Habilitationsschrift der Med.Fakultät München 1964
- (59) Meyer,A. E. Werle: In: Henning,N., K.Heinkel, H.Schön: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie des exokrinen Pankreas, Schattauer Verlag, Stuttgart 1964
- (60) Marx,R.: Klin.Demonstration der 1.Med.Univ. Klinik München, Nov. 1960
- (61) Marx,R., D.Clemente, E.Werle, W.Appel: Blut,5 (1959), 367
- (62) Steichele,D.F., H.J.Herschlein: Med.Welt 1961, 1855
- (63) Marx,R.: Hamburger Symposium über Blutgerinnung 1962
- (64) Busch,H.: Yale, J.Biol.Med., 29 (1957), 596
- (65) Werle,E., J.Trautschold: Münchn.Med.Wschr., 103 (1961), 713
- (66) Bernard,A., M.Paget, P.Lamelin: Arch.Mal. Appar.dig.49 (1960), 632
- (67) Forell,M.M.: Pharmacotherapia 1 (1963), 79

- (68) Henning,M., K.Heinkel, H.Schön: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Schattauer Verlag, Stuttgart 1964
- (69) Schön,H., B.Rässler, J.Alter: Clin.Chim.Acta, (1962), 571
- (70) Schega,W., R.Schultze: Chirurg, 31 (1960), 195
- (71) Hartley,F.K., F.R.Jevons: Biochem.J., 82 (1962) 18
- (72) Beuchelt,H.: Med.Z. (1963),763
- (73) Reichert,R., K.Hochstraßer, G.Fruhmann, H.Fritz, E.Werle: Pneumologie 147, 41-45 (1972)
- (74) M.Laskowski,F.C.Wu,J.Biol.Chem. 204,797 (1953)

A N H A N G

Schweinetrachealsekret

- Kurve 1 : 1. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
- Kurve 2 : 2. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
- Kurve 3 : Säulenlauf Inhibitorfraktion
- Kurve 4 : Trypsinhemmkurve
- Kurve 5 : Chymotrypsinhemmkurve
- Kurve 6 : Plasminhemmkurve
- Kurve 7 : Temporäre Hemmung
- Kurve 8 : Molekulargewichtsbestimmung

Rindertrachealsekret

- Kurve 9 : 1. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
- Kurve 10: 2. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
- Kurve 11: 3. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
- Kurve 12: Säulenlauf Inhibitorfraktion
- Kurve 13: Trypsinhemmkurve
- Kurve 14: Chymotrypsinhemmkurve
- Kurve 15: Plasminhemmkurve
- Kurve 16: Temporäre Hemmung
- Kurve 17: Molekulargewichtsbestimmung

Serum Schwein

- Kurve 18: 1. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
- Kurve 19: 2. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
- Kurve 20: Trypsinhemmkurve
- Kurve 21: Chymotrypsinhemmkurve
- Kurve 22: Molekulargewichtsbestimmung

Serum Rind

- Kurve 23: 1. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
Kurve 24: 2. Säulenlauf ungereinigtes Gesamtsekret
Kurve 25: Trypsinhemmkurve
Kurve 26: Chymotrypsinhemmkurve
Kurve 27: Molekulargewichtsbestimmung

Eichkurven

- Kurve 28: Eichkurve II, Schwein
Kurve 29: Eichkurve I, Rind

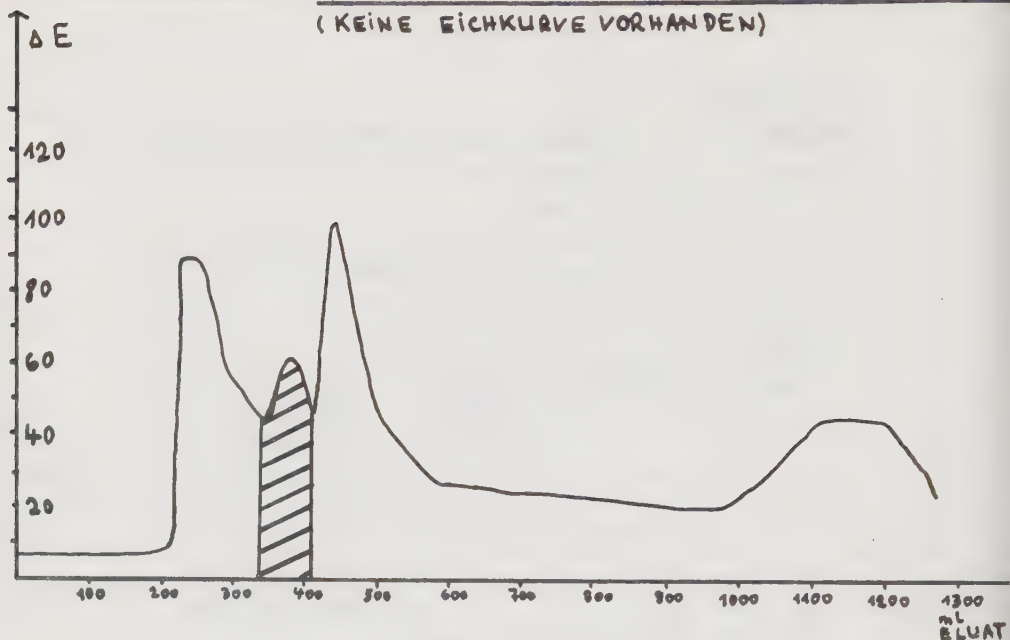
SCHWEIN

1. KURVE

TRACHEALSEKRET

1. SÄULENLAUF UNGEREINIGTES GESAMTSEKRET

(KEINE EICHKURVE VORHANDEN)

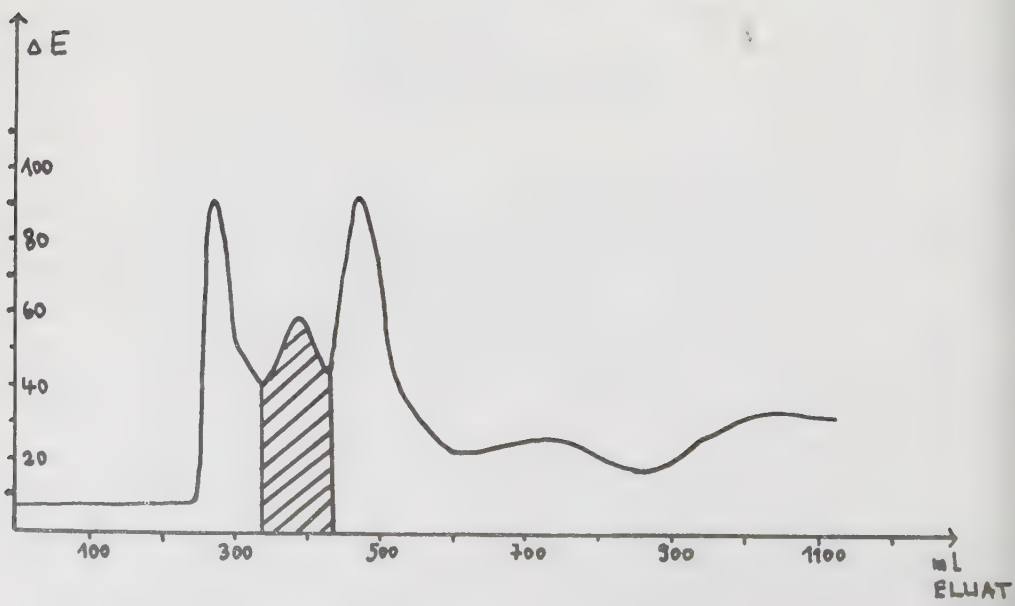


SCHWEIN

2. KURVE

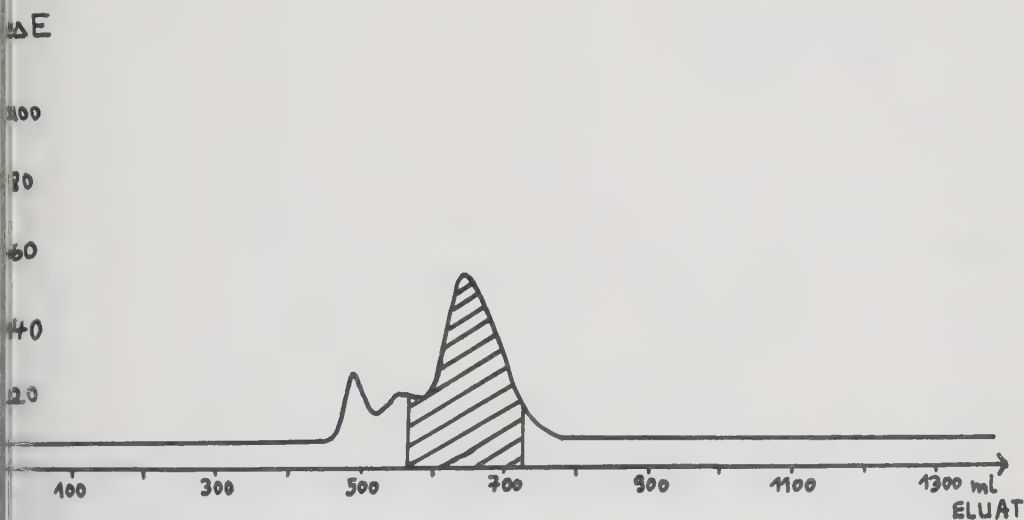
TRACHEALSEKRET

2. SÄULENLAUF UNGEREINIGTES SEKRET



SCHWEIN
TRACHEALSEKRET

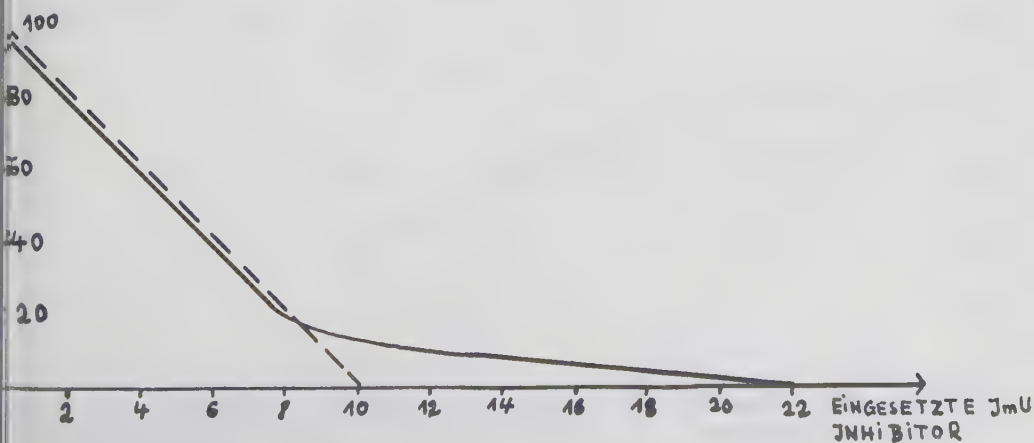
3. KURVE
SÄULENLAUF FRAKT II (INHIBITORFRAKTION)
(EICHKURVE II SCHWEIN)



SCHWEIN
TRACHEALSEKRET

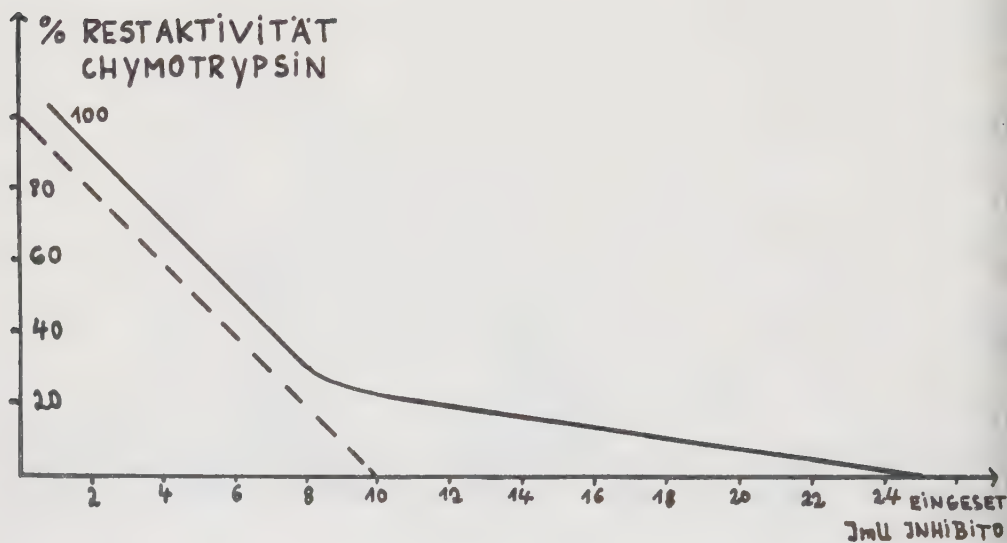
4. KURVE
TRYPsinHEMMKURVE

% RESTAKTIVITÄT
TRYPsin



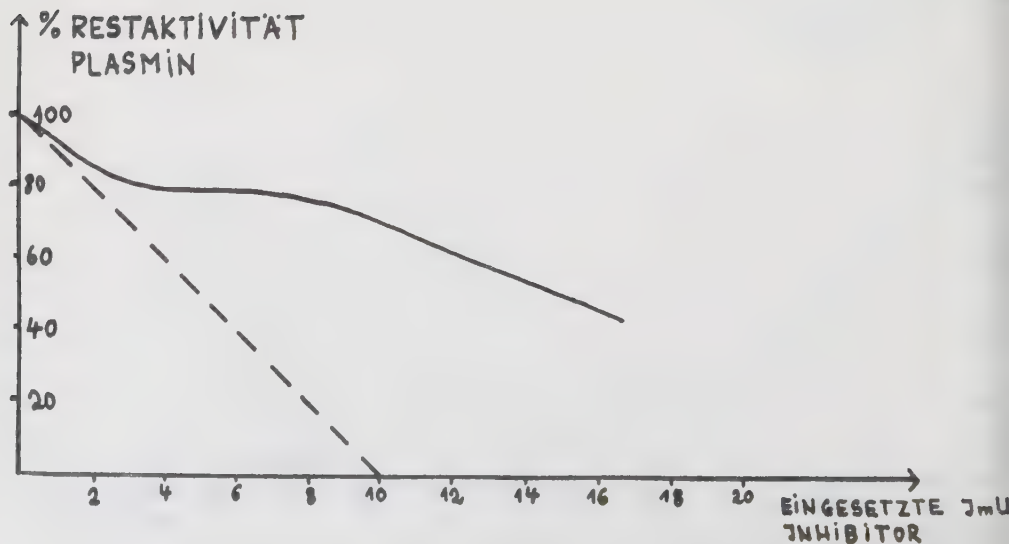
SCHWEIN
TRACHEALSEKRET

5. KURVE
CHYMOTRYPSINHEMMKURVE



SCHWEIN
TRACHEALSEKRET

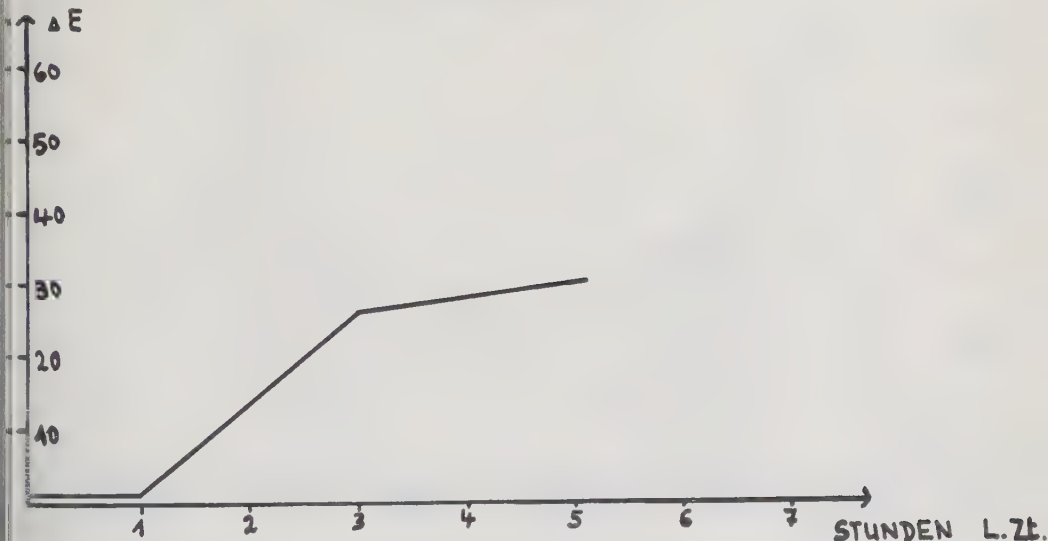
6. KURVE
PLASMINHEMMKURVE



SCHWEIN
TRACHEALSEKRET

TEMPORÄRE HEMMUNG

7. KURVE

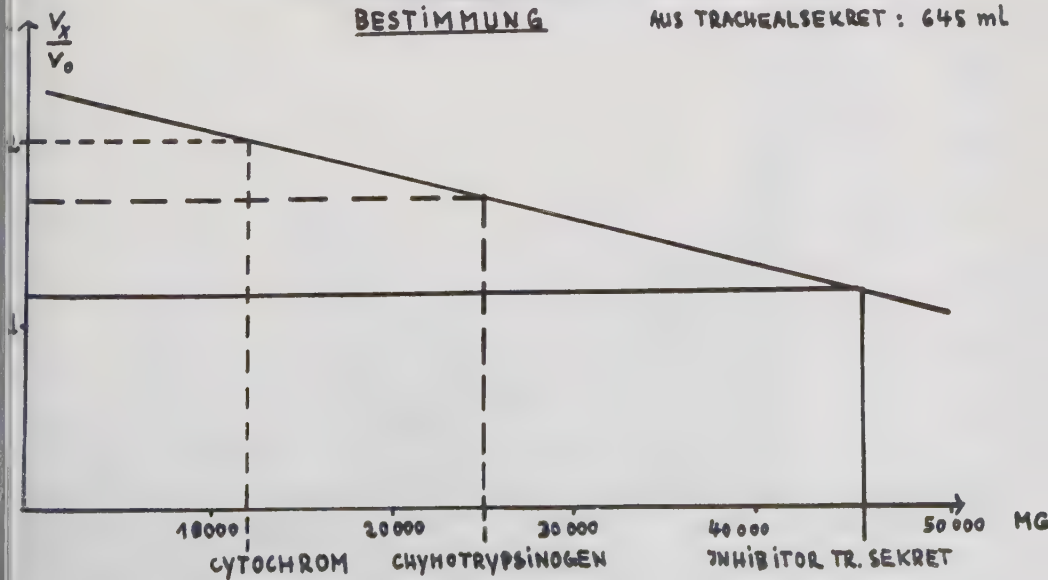


8. KURVE

SCHWEIN
TRACHEALSEKRET

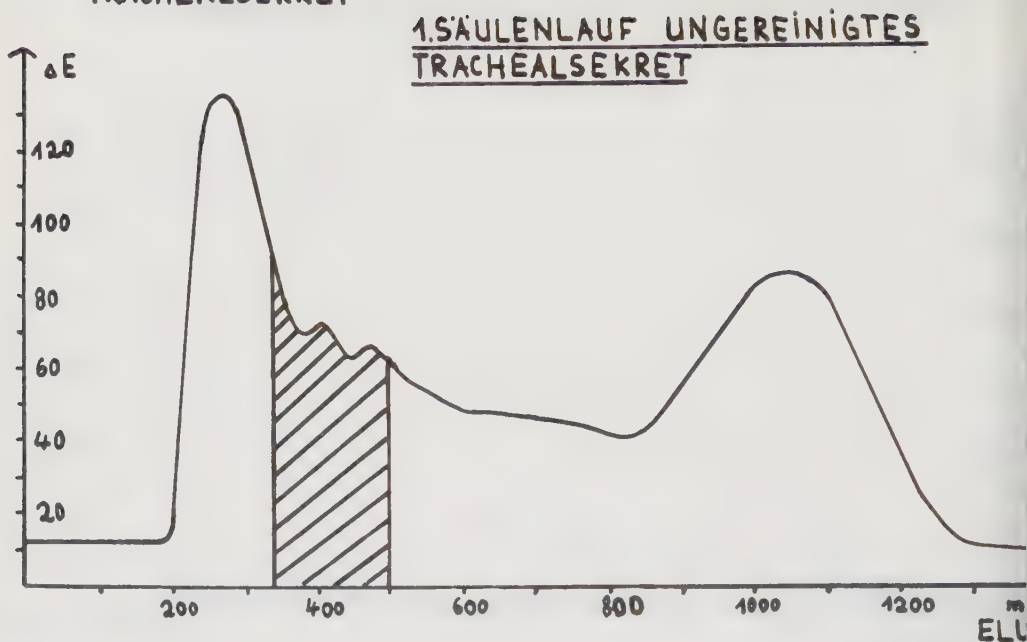
INNERES VOL : 553 ml
CHYHOTRYPSINOGEN : 925 ml
CYTOCHROM : 1121 ml
SCHWEINE INHIBITOR
AUS TRACHEALSEKRET : 645 ml

MOLEKULARGEWICHTS-
BESTIMMUNG



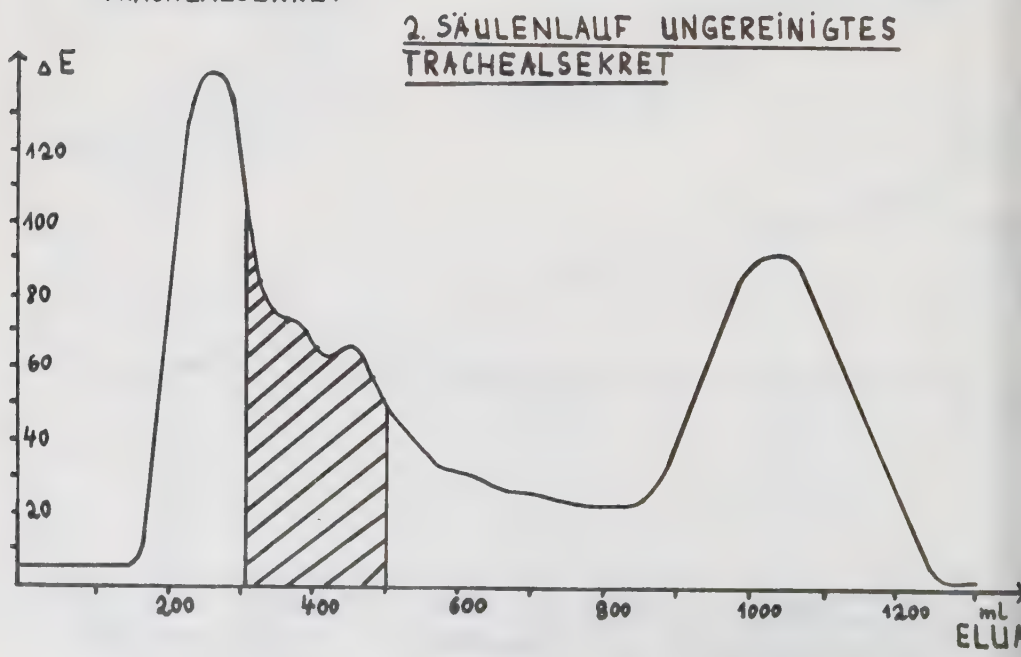
RIND
TRACHEALSEKRET

9. KURVE



RIND
TRACHEALSEKRET

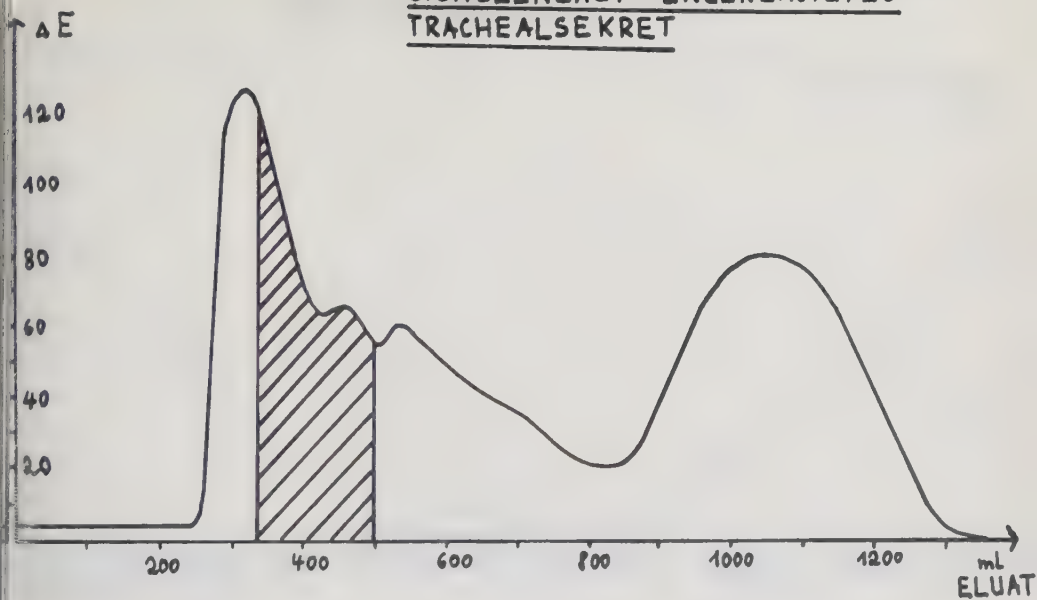
10. KURVE



RIND
TRACHEALSEKRET

11. KURVE

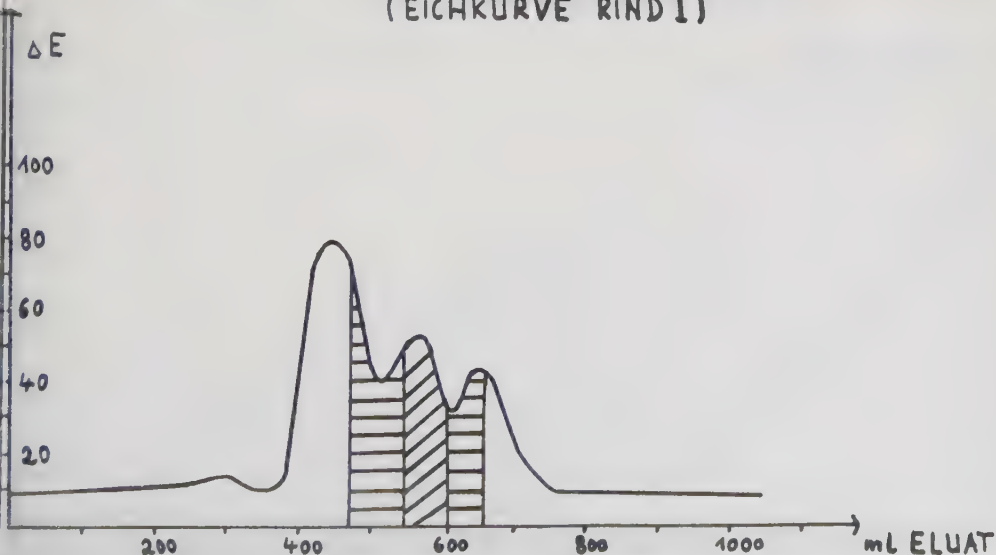
3. SÄULENLAUF UNGEREINIGTES
TRACHEALSEKRET



RIND
TRACHEALSEKRET

12. KURVE

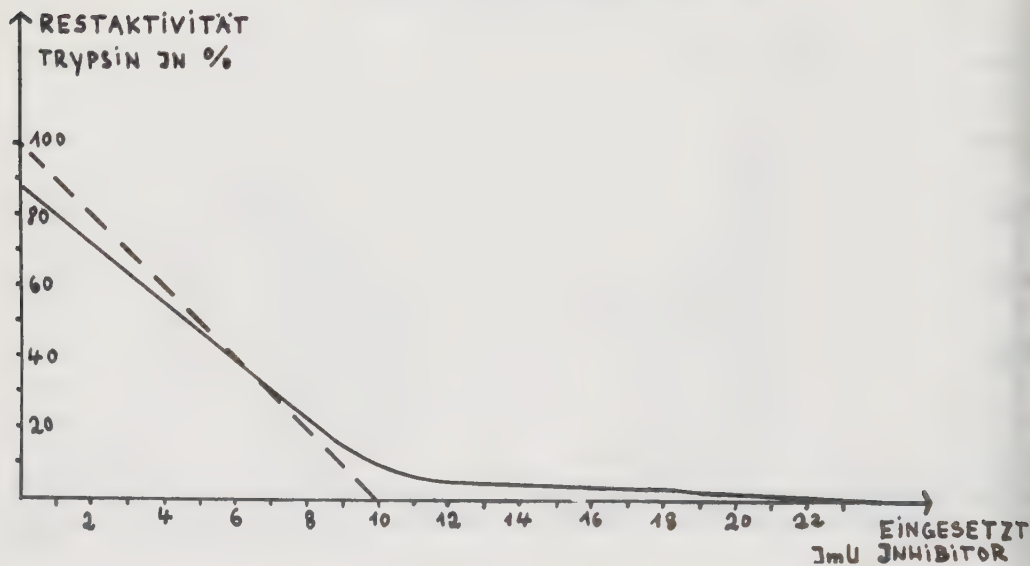
SÄULENLAUF FRAKTION II (JNH. FRAK.)
(EICKURVE RIND I)



RIND
TRACHEALSEKRET

13. KURVE

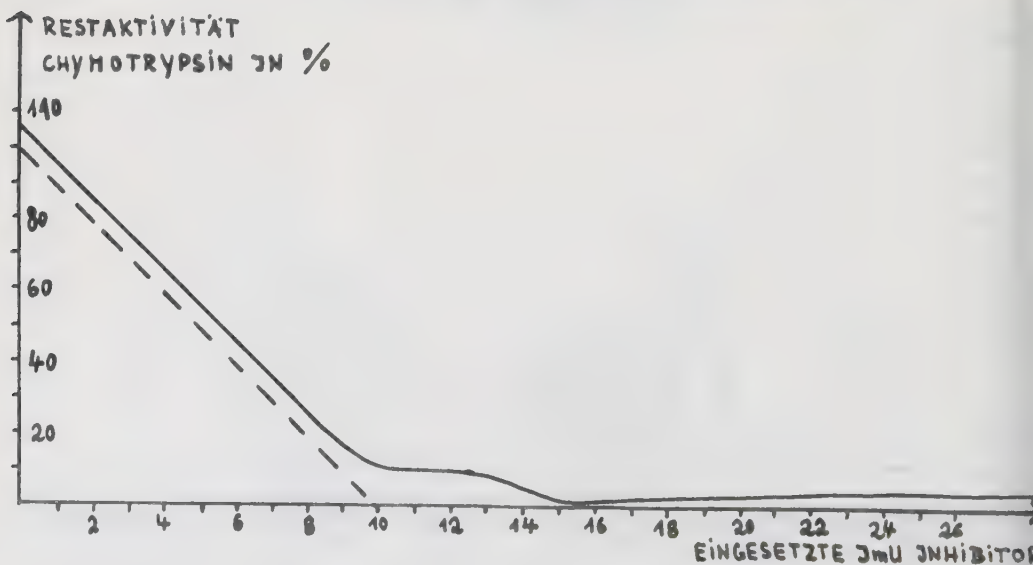
TRYPSINHEMMKURVE



RIND
TRACHEALSEKRET

14. KURVE

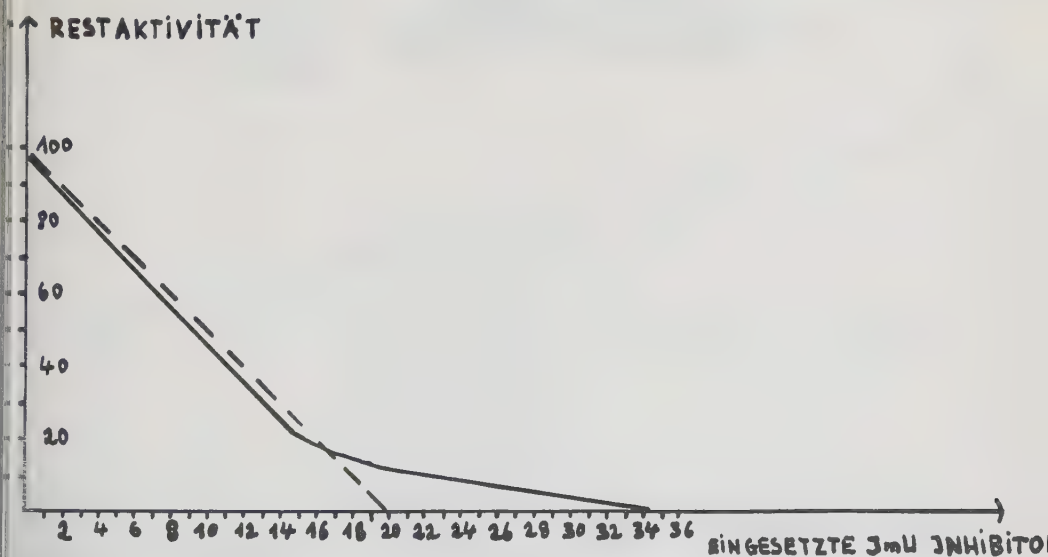
CHYMOTRYPSINHEMMKURVE



RIND
TRACHEALSEKRET

15. KURVE

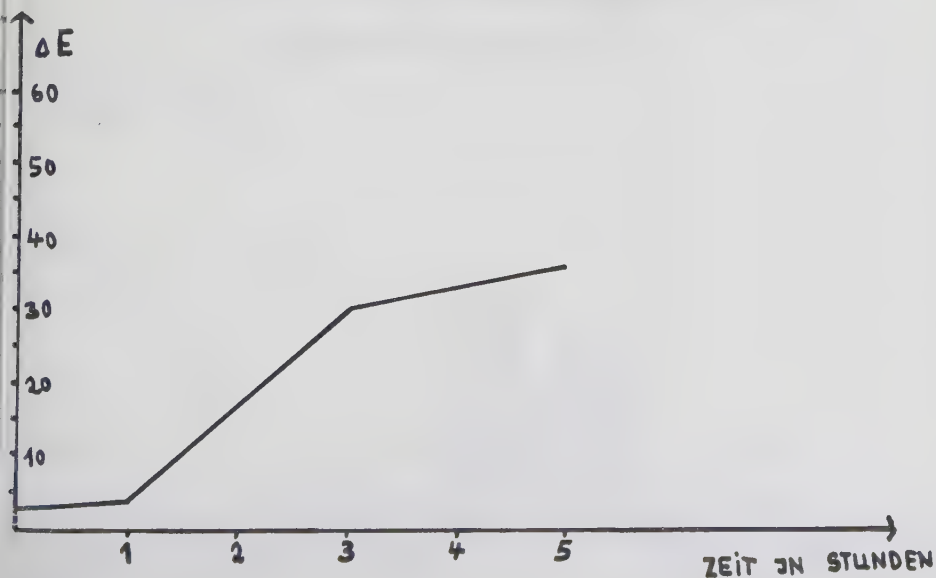
PLASMINHEMMKURVE



RIND
TRACHEALSEKRET

16. KURVE

TEMPORÄRE HEMMUNG

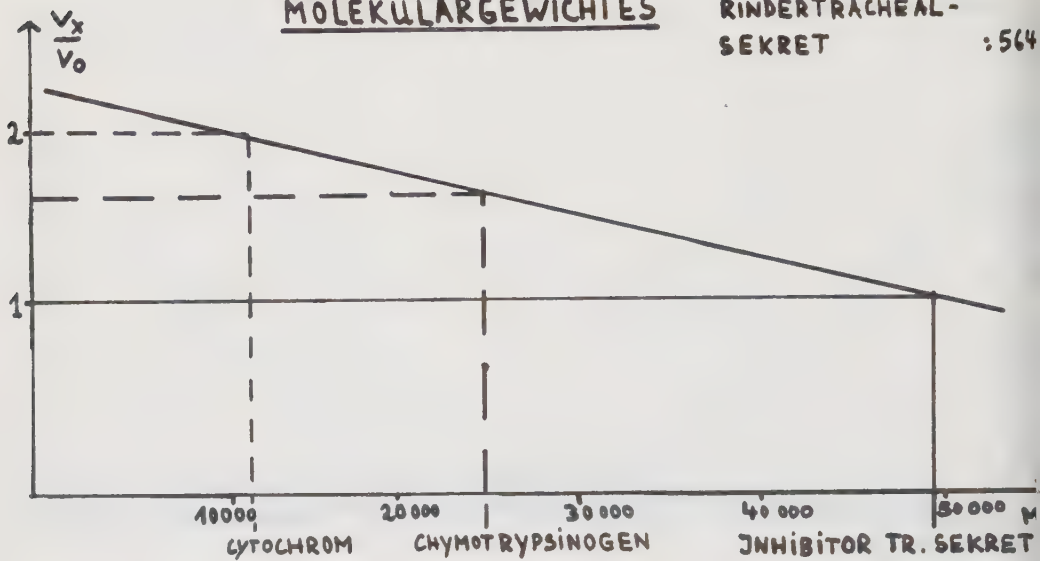


17. KURVE

RIND
TRACHEALSEKRET

INNERES VOL. : 523
CHYMOTRYPSINOGEN : 873
CYTOCHROM : 1061
INHIBITOR AUS
RINDERTRACHEAL-
SEKRET : 564

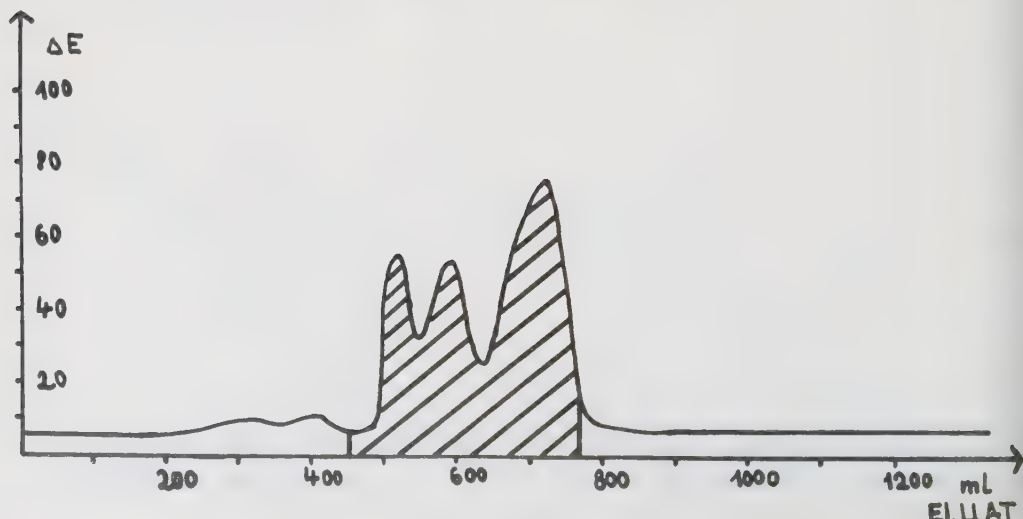
BESTIMMUNG DES
MOLEKULARGEWICHTES



SCHWEIN
SERUM

18. KURVE

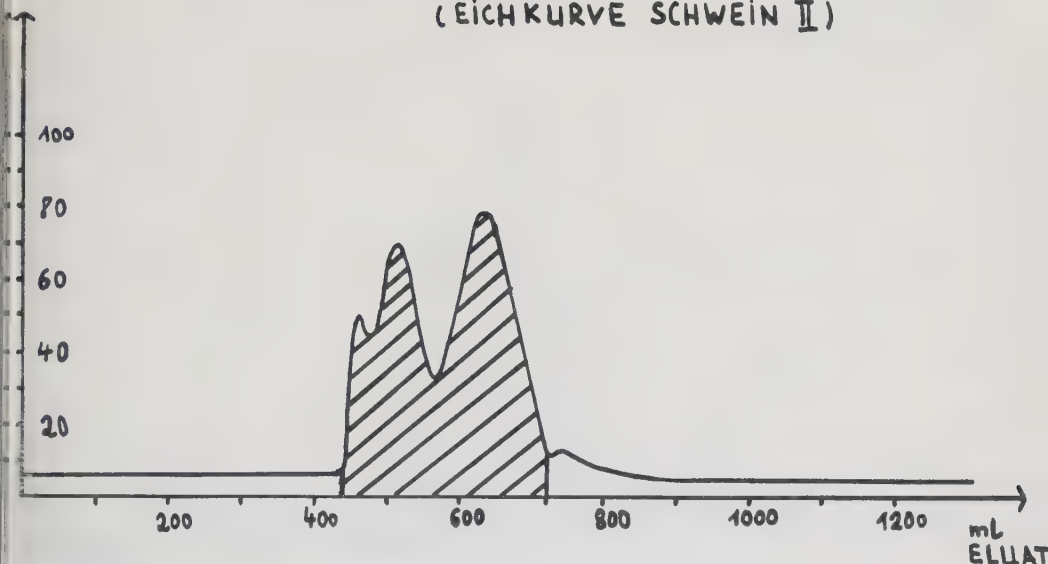
1. SÄULENLAUF UNFRAKTIONIERTES
SERUM
(EICHKURVE SCHWEIN II)



SCHWEIN
SERUM

19. KURVE

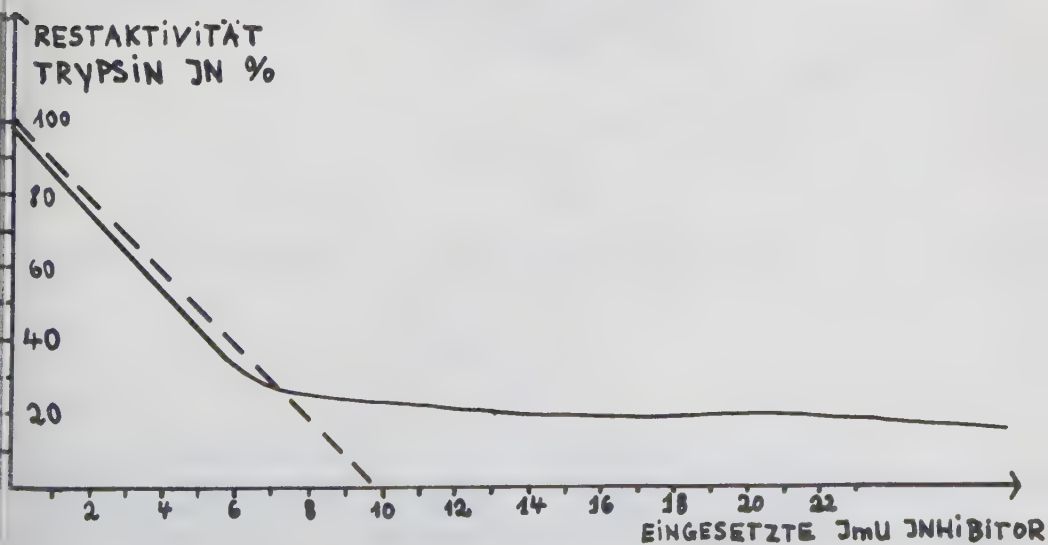
2. SÄULENLAUFLUF UNFRAKTIONIERTES
SERUM
(EICHKURVE SCHWEIN II)



SCHWEIN
SERUM

20. KURVE

TRYPSINHEMMKURVE

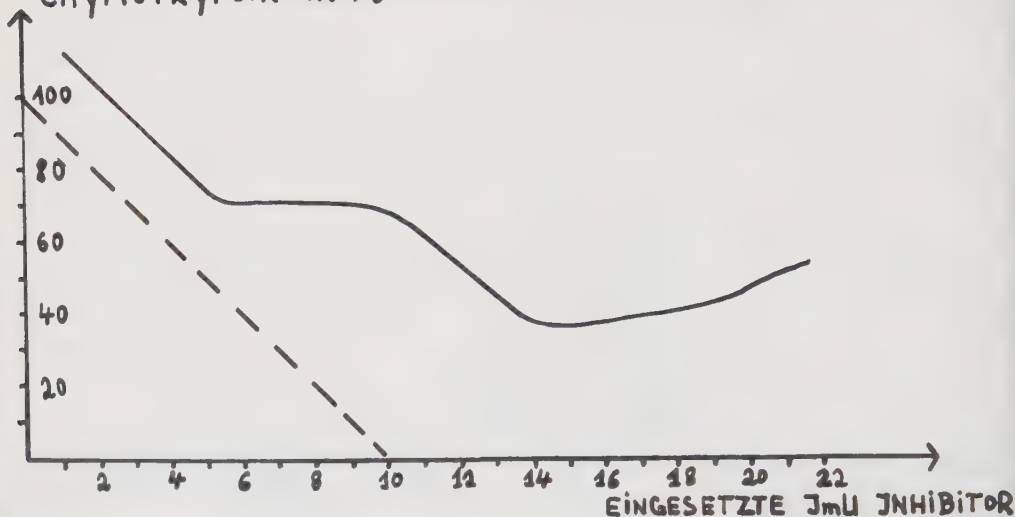


SCHWEIN
SERUM

21. KURVE

CHYMOTRYPSINHEMMKURVE

RESTAKTIVITÄT
CHYMOTRYPSIN JN %

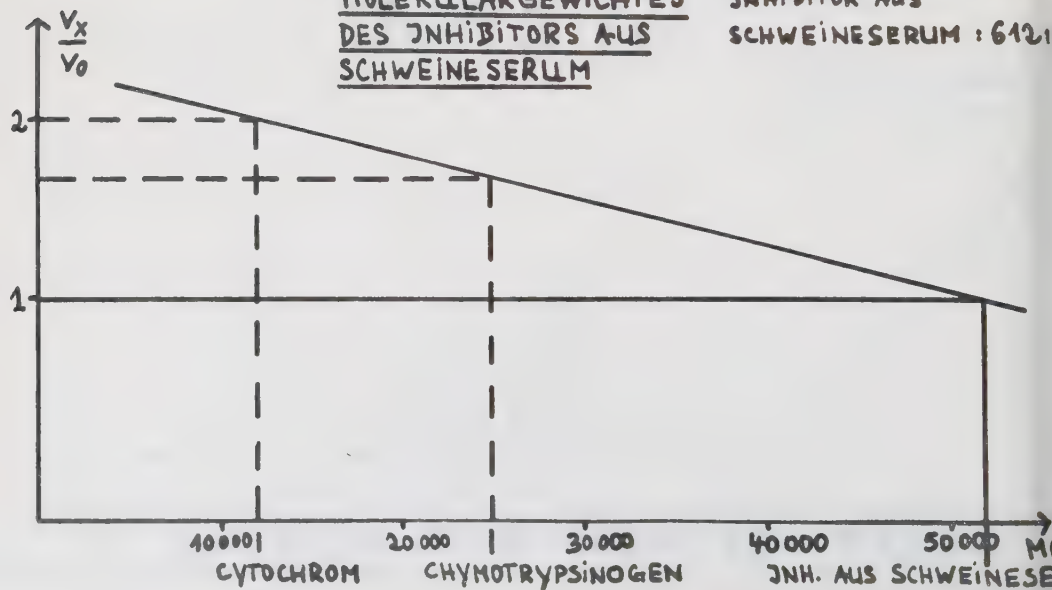


22. KURVE

SCHWEIN
SERUM

BESTIMUNG DES
MOLEKÜLLARGEWICHTES
DES INHIBITORS AUS
SCHWEINESERUM

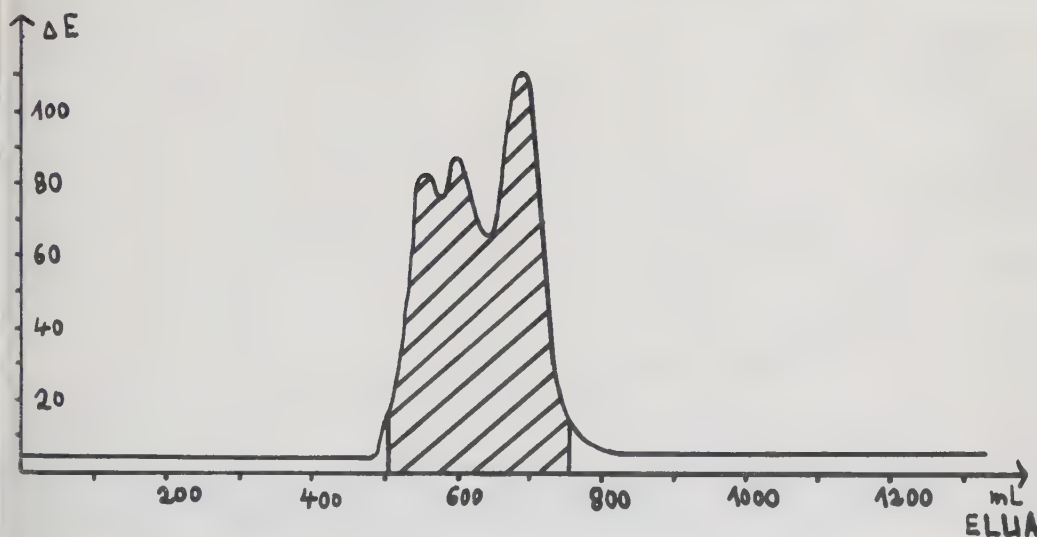
INNERES VOL. : 553 ml
CHYMOTRYPSINOGEN : 925 mg
CYTOCHROM : 1121 mg
INHIBITOR AUS
SCHWEINESERUM : 612 mg



RIND
SERUM

23. KURVE

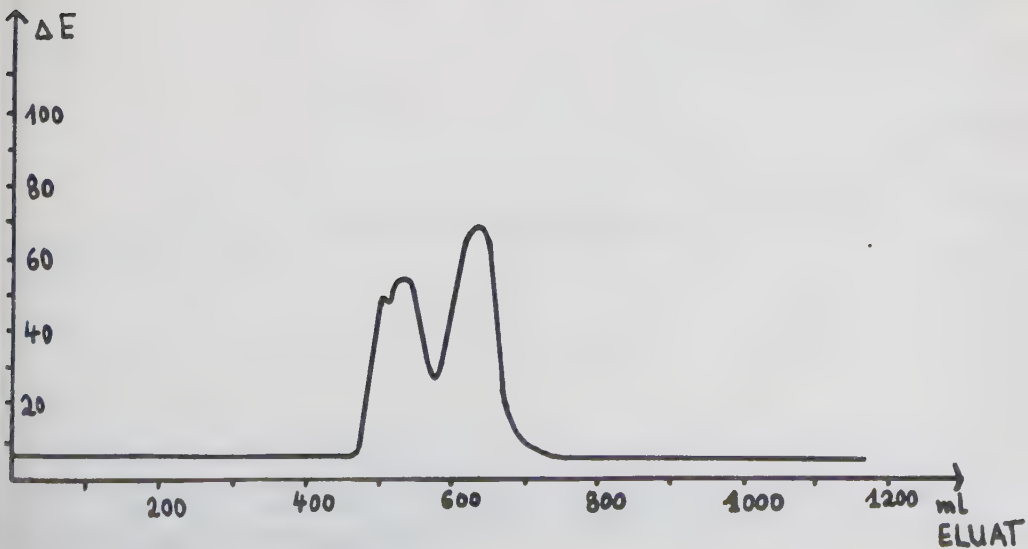
1. SÄULENLAUF UNFRAKTIONIERTES
RINDERSERUM



RIND
SERUM

24. KURVE

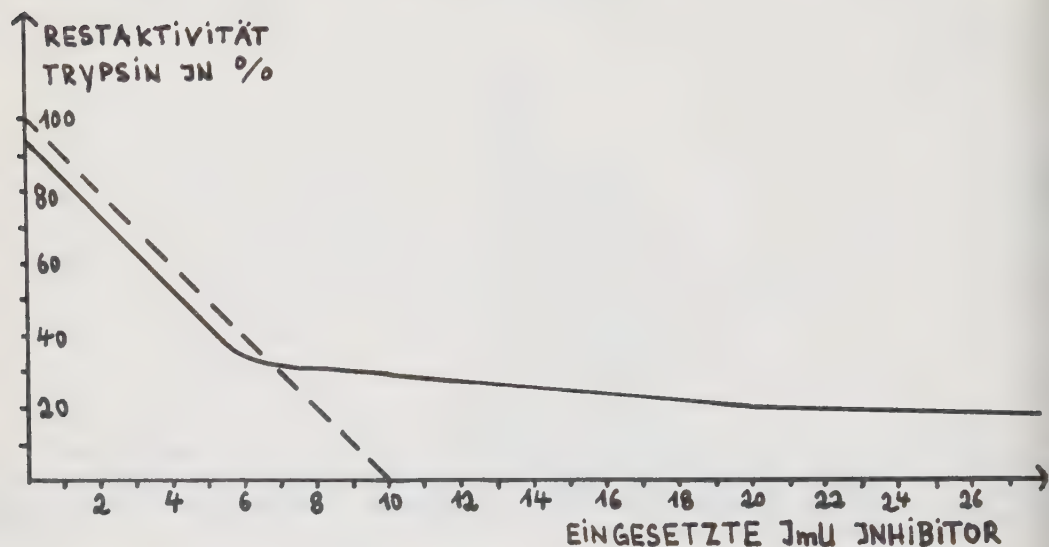
2. SÄULENLAUF UNFRAKTIONIERTES
RINDERSERUM



RIND
SERUM

25. KURVE

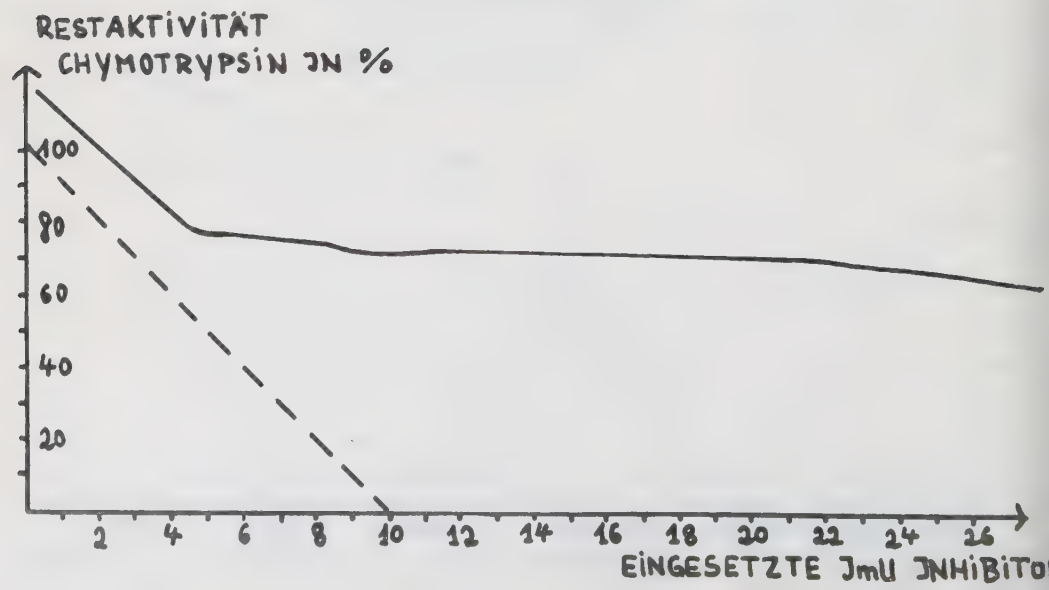
TRYPSINHEMMKURVE



RIND
SERUM

26. KURVE

CHYMOTRYPSINHEMMKURVE

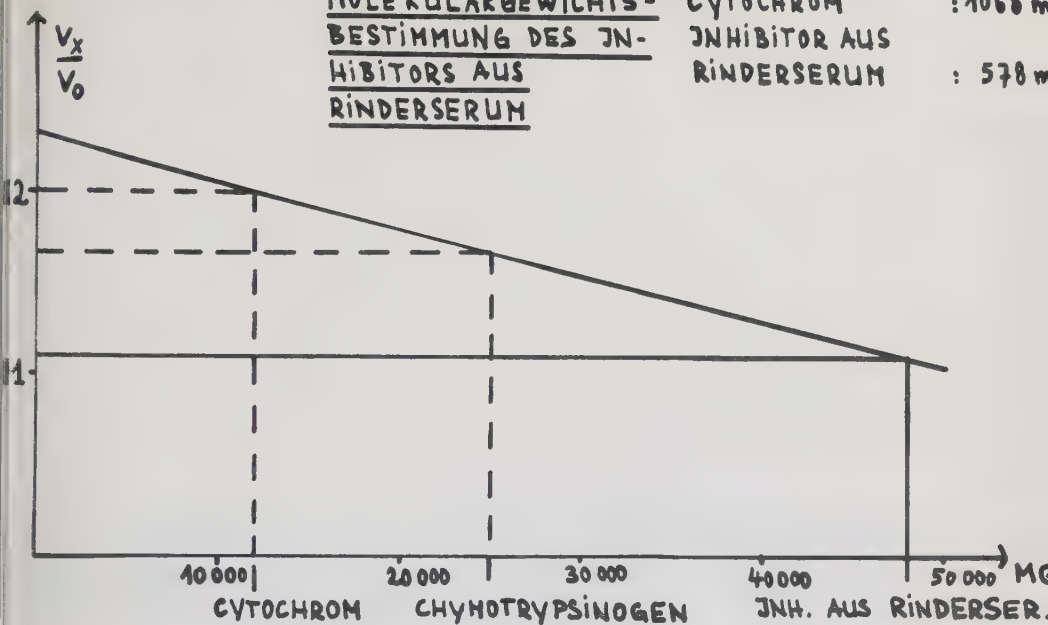


27. KURVE

RIND
SERUM

INNERES VOL. : 527 m
CHYMOTRYPSINOGEN: 878 m
CYTOCHROM : 1068 m
INHIBITOR AUS
RINDERSERUM : 578 m

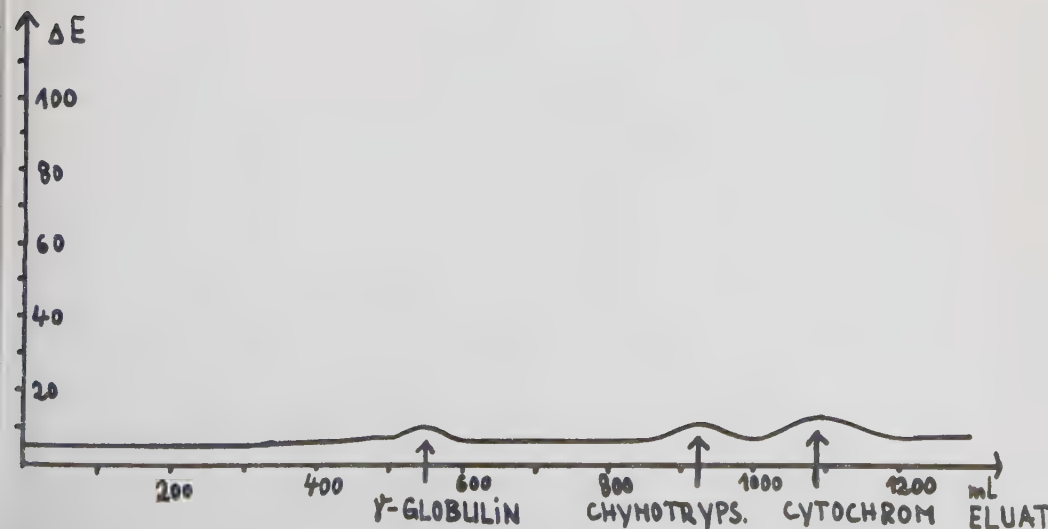
MOLEKULARGEWICHTS- BESTIMMUNG DES IN- HIBITORS AUS RINDERSERUM

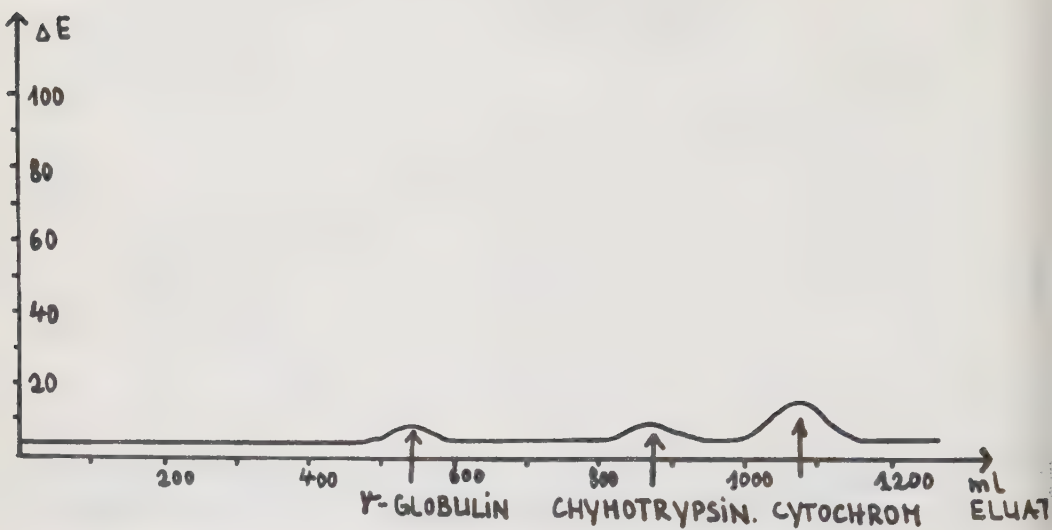


SCHWEIN

28. KURVE

EICKURVE II



EICHKURVE I

Lebenslauf

Am 4.11.46 wurde ich, Alfred, Helmut, Wilfried Sauer als Sohn von Frau Franziska Sauer und ihrem Ehemann Hans-Oswald Sauer in Kötschach-Mauthen, Kärnten, Österreich, geboren. Umzug nach Kassel/Hessen und Erwerb der deutschen Staatsbürgerschaft im Jahre 1947. Besuch der Volksschule in Kassel von Ostern 1953 bis Ostern 1957. Dann Besuch des Gymnasiums dortselbst bis Weihnachten 1957. Umzug nach Saarbrücken und Einschulung in das Knabenrealgymnasium Anfang 1958. Abitur an derselben Schule 1966 im Frühjahr. Vom 1.4.1966 bis 31.3.1968 freiwilliger Dienst als Sanitäter bei der Bundeswehr. Entlassungsdienstgrad Oberfähnrich. Beginn des Medizinstudiums im Sommersemester 1968 an der Universität München. Ablegen des Physikums nach dem Sommersemester 1970, Ablegen des Staatsexamens nach dem Wintersemester 1973/74, beide Male an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München. Die mündliche Prüfung zur Doktorarbeit fand am 26.11.74 an der Medizinischen Fakultät der Universität München statt.

Wilfried Sauer

